BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Manipulations d'analyse biochimique

M. Gavrilovic
M.-J. Maginot
C. Schwartz-Gavrilovic
J. Wallach



nouvelle édition

doin

Dans la même collection

Biochimie métabolique
Cl. AUDIGIÉ, F. ZONSZAIN, 3[e] édition, 1993, 270 pages.

Biochimie structurale
Cl. AUDIGIÉ, F. ZONSZAIN, 3[e] édition, 1991, 268 pages.

Principes des méthodes d'analyse biochimique
Cl. AUDIGIÉ, G. DUPONT, F. ZONSZAIN
Tome 1, 2[e] édition, 1995, 220 pages
Tome 2, 2[e] édition, 1992, 174 pages.

Hématologie. Aspects théoriques et pratiques
M. CHARRIN, P. VANNESTE, 1991, 224 pages dont 8 en 4 couleurs.

Génie enzymatique
G. COUTOULY, 1991, Co-édition Doin/Masson, 250 pages.

Travaux dirigés de biochimie
G. COUTOULY, E. KLEIN, E. MEYER, 2[e] édition, 1991, 280 pages.

Génie fermentaire. Travaux pratiques
F. DENEUVILLE, 1991, 308 pages.

Virologie moléculaire
M. GIRARD, L. HIRTH, 1989, 624 pages.

Biotechnologies. Principes et méthodes
M. LARPENT-GOURGAUD, J.-J. SANGLIER, 1992, 668 pages.

Microbiologie générale
H. LECLERC, D. IZARD, M.O. HUSSON, P. WATTRE, E. JAKUBCZAK, 3[e] édition, 1986, 369 pages.

Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments
H. LECLERC, D.A.A. MOSSEL, 1989, 548 pages.

Génie enzymatique. Travaux pratiques
D. LONCLE, 1992, 416 pages.

Génie génétique
D. LONCLE, M. AMAUDRIC, C. JACOTY, 1993, 456 pages.

Le laboratoire de bactériologie. Équipement et techniques de base
M. MARCHAL, J.-L. BOURDON, F. BIMET, 1988, 507 pages.

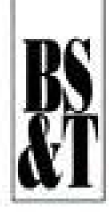
Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries
M. MARCHAL, J.-L. BOURDON, Cl. RICHARD, 4[e] édition, 1991, 516 pages.

Cours de microbiologie générale. Nouveau programme
A. MEYER, J. DEIANA, H. LECLERC, nouvelle édition, 1994, 388 pages.

Annales et exercices de microbiologie générale
A. MEYER, J. DEIANA, 1994, 80 pages.

Exercices de biochimie
F. LAFONT, C. PLAS, P. CAZAUBON, 1995, 400 pages.

Manipulations d'analyse biochimique
M. GAVRILOVIC, M.-J. MAGINOT, Cl. SCHWARTZ-GAVRILOVIC, J. WALLACH, 1996, 3[e] édition revue et corrigée, 460 pages, 91 tableaux.



BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Manipulation d'analyse biochimique

Troisième édition revue et corrigée

Michel Gavrilovic

Professeur agrégé de biochimie - génie biologique. Inspecteur pédagogique régional

Marie-Josèphe Maginot

Professeur agrégé de biochimie - génie biologique. Lycée Libergier, Reims

Claude Schwartz-Gavrilovic

Professeur agrégé de biochimie - génie biologique. ENCPB, Paris

Jean Wallach

Ingénieur E.S.C.I.L. Docteur ès-Sciences. Professeur des Universités, Université de Lyon I

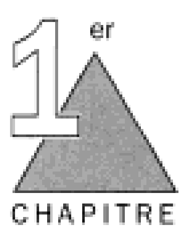
doin éditeurs - paris

DOIN ÉDITEURS
BP 60
26, avenue de l'Europe
78141 Vélizy Cedex

ISBN 2-7040-0836-1

Imprimé en France

SOMMAIRE



PRÉPARATION D'UN TAMPON PHOSPHATE

SOMMAIRE

PAGE

Le but de la manipulation est de réaliser une solution tampon de pH exactement connu : un tampon phosphate à 0,1 mol.dm^{-3}, pH = 7.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **force d'un acide ;**
- **pH équivalent ;**
- **constante d'acidité K_A et pK_A ;**
- **pouvoir tampon ;**
- **force ionique ;**
- **concentration molaire – activité d'un ion.**

1. PRINCIPE

1.1. pH d'une solution aqueuse

Par définition le pH d'une solution aqueuse est le cologarithme décimal de l'activité de la solution en ions hydrogène ou en ions hydronium. Il s'exprime en unités de pH. Pour des concentrations faibles ($C_{H_3O^+} \leq 0{,}01$ mol.dm^{-3}) : $(H_3O^+) = [H_3O^+]$

$$pH = \text{colog}\ (H_3O^+) = -\log(H_3O^+) \text{ et } (H_3O^+) = 10^{-pH}$$

1.2. Solution tampon, pouvoir tampon

Une solution tampon est une solution dont le pH varie très peu :
- lors d'addition d'ions OH^- ou d'ions H_3O^+ dans certaines limites de concentrations ;
- lors d'une dilution de la solution tampon.

Pour un couple acide-base donné, la solution tampon la plus efficace est obtenue par le mélange équimoléculaire de l'acide faible et de sa base conjuguée ;
soit : [acide] = [base] ;
c'est-à-dire pour pH = pK_A (K_A constante d'acidité du couple acide – base considéré).

1.3. Solution tampon phosphate pH = 7

L'acide phosphorique H_3PO_4 est un triacide dont les acidités correspondent aux équilibres acido-basiques suivants :

$H_3PO_4 + H_2O \rightleftharpoons H_2PO_4^- + H_3O^+$ $pK_{A1} = 2,15$

$H_2PO_4^- + H_2O \rightleftharpoons HPO_4^{2-} + H_3O^+$ $pK_{A2} = 7,20$

$HPO_4^{2-} + H_2O \rightleftharpoons PO_4^{3-} + H_3O^+$ $pK_{A3} = 12,38$

les pK_A respectifs (pK_{A1}, pK_{A2}, pK_{A3}) étant mesurés à 25 °C et sur des solutions diluées ($C \leq 0,01$ mol.dm^{-3}).

A pH = 7, les formes ioniques présentes sont :
HPO_4^{2-} (ion monohydrogénophosphate) ;
$H_2PO_4^-$ (ion dihydrogénophosphate).

Pour préparer une solution tampon de pH = 7, on utilise donc un mélange de ces deux formes ioniques.

Au voisinage de pH = 7, c'est la constante d'acidité K_{A2} du couple $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ qui est impliquée. Mais pour une concentration en phosphate voisine de 0,1 mol.dm^{-3}, il importe de tenir compte des activités des différents ions.

Ainsi : $pH = pK_{A2} + \log \dfrac{(HPO_4^{2-})}{(H_2PO_4^-)}$

La concentration C des ions est reliée à l'activité a par la relation :

$$a = \gamma \cdot C$$

où γ est le coefficient d'activité.

D'où en remplaçant a par $\gamma \cdot C$ dans l'expression du pH, on obtient

$$pH = pK_{A2} + \log \frac{\gamma_1 [HPO_4^{2-}]}{\gamma_2 [H_2PO_4^-]}$$

ce qui peut encore s'écrire :

$$pH = pK_{A2} + \log \left(\frac{\gamma_1}{\gamma_2}\right) + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

Dans les conditions de concentration et de température précisées plus haut :

$$\log \left(\frac{\gamma_1}{\gamma_2}\right) = -0,35$$

et on en déduit que : $pK_{A'_2} = pK_{A_2} - 0{,}35 = 7{,}20 - 0{,}35 = 6{,}85$

$$\text{d'où : } pH = pK_{A'_2} + \log\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

$$\text{soit : } pH = 6{,}85 + \log\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

La préparation d'une solution tampon phosphate à 0,1 $mol.dm^{-3}$, pH = 7 consiste alors à introduire les deux ions HPO_4^{2-} et $H_2PO_4^-$ en proportions convenables à partir de solutions mères de concentrations connues.

Les proportions entre les deux formes ioniques se déduisent des deux équations suivantes :

– d'une part : $[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-] = 0{,}1\ mol.dm^{-3}$ (1)

$$\text{– d'autre part : } \log\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 7 - 6{,}85 = 0{,}15$$

$$\text{soit : } \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 1{,}41 \qquad (2)$$

Ce qui permet d'obtenir :

$$[HPO_4^{2-}] = 0{,}0585\ mol.dm^{-3}$$

$$[H_2PO_4^-] = 0{,}0415\ mol.dm^{-3}$$

Il faut donc introduire 0,0585 mole d'ions HPO_4^{2-} et 0,0415 mole d'ions HPO_4^- pour un litre de solution tampon.

1.4. Solution tampon tétraborate de sodium (borax) pH = 9,2

En dissolvant du borax ou tétraborate de sodium décahydraté (borax pur pour analyses : $Na_2B_4O_7$, $10H_2O$, masse molaire 381,37 $g.mol^{-1}$) dans de l'eau distillée, il est possible de préparer une solution tampon de pH = 9,2 à 25 °C.

Dissolution du borax en milieu aqueux :

$$\underset{\text{ion tétraborate}}{B_4O_7^{2-}} + 9H_2O \longrightarrow 2\ \underset{\text{ion borate}}{B(OH)_4^-} + 2\ \underset{\text{acide borique}}{H\,B(OH)_4}$$

La dissolution de l'ion tétraborate conduit à une solution équimoléculaire en acide borique et en ion borate. Le pH de cette solution aqueuse est donc constant et égal au pK_A du couple acide-base $H\ B(OH)_4$ / $B(OH)_4^-$, soit 9,2 à 25 °C.

REMARQUE : la solubilité du borax étant d'environ 50 g.dm^{-3} à température ordinaire, il convient de préparer une solution de concentration molaire C ≤ 0,1 mol.dm^{-3}.

Conseils pratiques pour la préparation et la conservation de solutions tampons ou de solutions étalons de PH

– Les solutions tampons doivent être préparées à partir de produits commerciaux purs, vendus pour la préparation de solutions étalons (RP pour analyses).

– Utiliser de l'eau déminéralisée par distillation ou par permutation. Faire bouillir cette eau extemporanément pendant une quinzaine de minutes puis limiter la dissolution du dioxyde de carbone atmosphérique pendant le refroidissement et la conservation.

– Conserver les solutions tampons dans des flacons bouchés en polyéthylène ou en verre.

– La plupart des solutions tampons ou étalons de pH sont altérables (moisissures, troubles, dépôts...). Pour augmenter leur durée de conservation, il est possible d'ajouter un cristal de thymol.

2. RÉACTIFS

- *Dihydrogénophosphate de potassium pur pour analyses* et anhydre :

  (KH_2PO_4 : masse molaire = 136,09 g.mol^{-1}).

- *Monohydrogénophosphate de sodium dodécahydraté pur pour analyses :*

  (Na_2HPO_4, 12 H_2O : masse molaire = 358 g.mol^{-1}).

- *Tétraborate de sodium décahydraté pur pour analyses :*

  ($Na_2B_4O_7$, 10 H_2O : masse molaire = 381,37 g.mol^{-1}).

- *Solution d'hydroxyde de sodium* à 0,2 mol.dm^{-3}.

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Standardisation du pHmètre : préparation de 100 cm^3de tampon tétraborate de sodium (borax) à 0,01 $mol.dm^{-3}$

Dissoudre m = 0,381 g de tétraborate de sodium ($Na_2B_4O_7$, 10 H_2O) dans de l'eau distillée puis compléter à 100 cm^3.

3.2. Etude expérimentale de l'effet tampon de la solution phosphate à 0,1 $mol.dm^{-3}$, pH = 7

– Préparer environ 100 cm^3 de solution tampon phosphate à 0,1 $mol.dm^{-3}$, à partir de deux solutions mères phosphates à 1 $mol.dm^{-3}$ préparées par pesées de dihydrogénophosphate de potassium pur et de monohydrogénophosphate de sodium dodécahydraté pur.

– Standardiser le pHmètre au moyen de la solution tampon borax.

Mesurer le pH du tampon phosphate préparé.

REMARQUE : les solutions phosphates préparées peuvent être stockées en vue d'une utilisation ultérieure (enzymologie).

3.3. Etude expérimentale de l'effet tampon de la solution phosphate préparée

Afin de mesurer la capacité du tampon phosphate préparé, à s'opposer à une modification du pH :

– Introduire dans un bécher de 100 cm^3, E = 20 cm^3 de solution tampon pH = 7.

– Mesurer le volume V_{OH^-} d'hydroxyde de sodium à 0,2 $mol.dm^{-3}$ nécessaire pour faire augmenter le pH de la solution tampon d'une unité pH (pH = 8).

3.4. Questions

1) Expliquer la préparation de la solution tampon phosphate pH = 7 : masses pesées, la technique opératoire choisie.

2) Exprimer la capacité du tampon en moles d'ions OH^- par litre de tampon et par unité pH.

3) Calculer la force ionique de la solution tampon préparée.

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. Préparation de la solution tampon phosphate 0,1 mol.dm^{-3}, pH = 7

4.1.1. Préparation de solutions mères phosphates à 1 mol.dm^{-3}

- Lire les indications portées par le fabriquant sur l'étiquette du flacon commercial :
- % de pureté ;
- hydratation ;
- masse molaire (M g.mol^{-1}).

- Calculer la masse m à peser pour réaliser 100 cm^3 de solution à 1 mol.dm^{-3} :

$m = n \cdot M = C \cdot U \cdot M = 1 \cdot 100 \cdot 10^{-3} \cdot M = 0{,}1\ M$

Préparation de la solution de monohydrogénophosphate de sodium à 1 mol.dm^{-3}

– Dans un bécher de 100 cm^3 propre et sec, peser à 0,01 g près exactement m g de produit préalablement séché pendant deux heures à 110 – 130 °C : $m_{Na_2HPO_4}$ = 35,80 g.

– Introduire environ 40 cm^3 d'eau distillée en agitant avec un agitateur de verre (agitateur de quanti) ou sous agitation magnétique.

– Attendre la complète dissolution du produit.

– Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 cm^3 (il n'est pas nécessaire de sécher une fiole jaugée après nettoyage et rinçage à l'eau distillée, si elle est destinée à préparer une solution aqueuse).

Rincer soigneusement le bécher à l'eau distillée et joindre les eaux de rinçage à la fiole jaugée.

– Amener le niveau de liquide à 1 cm environ en dessous du trait repère, avec de l'eau distillée.

– Laisser reposer deux minutes environ afin que le liquide adhérant sur le col puisse être drainé (ou essuyer les gouttelettes d'eau éventuellement présentes, au moyen d'un papier filtre, sans atteindre le ménisque de la solution).

– Ajuster le bas du ménisque sur le trait repère en faisant couler l'eau distillée nécessaire (pipette compte-gouttes) le long du col à partir d'un point situé à moins de 1 cm au-dessus du trait repère.

– Transférer dans un flacon en verre de 125 cm^3 environ, muni d'un bouchon et étiqueter en notant : la date, le nom et la concentration molaire du réactif, en vue d'un stockage de la solution préparée.

Préparation de la solution de dihydrogénophosphate de potassium à 1 mol.dm^{-3}

Procéder de la même manière : $m_{KH_2PO_4} = 13,61$ g.

4.1.2. Réalisation de 100 cm^3 de solution 0,1 mol.dm^{-3}, pH = 7

Rappels de calculs : dilution d'une solution de concentration initiale C_i à la concentration finale C_f

La quantité de matière (n_i) prélevée par un volume E cm^3 de C_i est égale à $C_i \cdot E \cdot 10^{-3}$. Cette quantité de matière n'est pas modifiée lors de la préparation de la solution finale C_f. On peut donc écrire $n_i = n_f$

où n_f est la quantité de matière présente dans le volume U cm^3 de solution finale préparée : $n_f = C_f \cdot U \cdot 10^{-3}$.

On en déduit : $C_i \cdot E \cdot 10^{-3} = C_f \cdot U \cdot 10^{-3}$

soit : $C_i \cdot E = C_f \cdot U$

Le coefficient de dilution est alors : $d = \dfrac{C_i}{C_f} = \dfrac{U}{E}$

• *Calcul des volumes (E) de solutions initiales à prélever* pour préparer U = 100 cm^3 de solution tampon :

– concentrations initiales : $C_i = 1$ mol.dm^{-3} ;

– concentrations finales : C_f : $[HPO_4^{2-}] = 0,0585$ mol.dm^{-3}
$[H_2PO_4^-] = 0,0415$ mol.dm^{-3}

$$C_i \cdot E = C_f \cdot U$$

d'où : $E = \dfrac{C_f}{C_i} \cdot U$

soit :
– pour la solution de monohydrogénophosphate de sodium :

$$E = \frac{0,0585}{1} \cdot 100 = 5,85 \text{ cm}^3$$

– pour la solution de dihydrogénophosphate de potassium :

$$E = \frac{0,0415}{1} \cdot 100 = 4,15 \text{ cm}^3$$

• Dans une fiole jaugée de 100 cm^3 introduire (pipette graduée de 5 cm^3 ou semi-microburette de 10 cm^3) :
– 5,85 cm^3 de la solution de monohydrogénophosphate de sodium à 1 mol.dm^{-3} ;
– 4,15 cm^3 de la solution de dihydrogénophosphate de potassium à 1 mol.dm^{-3}.

Compléter à 100 cm^3 avec de l'eau distillée. Boucher avec du parafilm. Homogénéiser par retournement.

Transvaser dans un bécher propre pour vérifier le pH de la solution préparée. Le pH doit être égal à 7. Le pH mesuré sera égal à 7 pour une température comprise entre 25 °C et 30 °C mais il sera augmenté de 0,004 unité pH par degré Celsius inférieur à 25 °C, dans l'intervalle 10 °C – 25 °C.

Pour ajuster éventuellement le pH à 7 (température égale à 25 °C) ou à un pH supérieur (température de laboratoire inférieure à 25 °C), il faut utiliser (pipette compte-gouttes) :
– la solution de monohydrogénophosphate de sodium pour augmenter le pH de la solution tampon (base conjuguée) ;
– la solution de dihydrogénophosphate de potassium pour diminuer le pH de la solution tampon (acide faible).

Transvaser dans un flacon de conservation étiqueté.

4.2. Calculs

Capacité du tampon : $\frac{C_{OH^-} \cdot V_{OH^-}}{E_{\text{solution tampon}}}$ $mol \cdot dm^{-3}$ par unité de pH

4.3. Calcul de la force ionique du tampon phosphate 0,1 mol.dm^{-3}, pH = 7

Définition de la force ionique d'une solution aqueuse :

$I = 1/2 \sum (C_i \times Z_i^2)$

$I = 1/2 (2 \times 0{,}0585 \times 1^2 + 0{,}0585 \times 2^2 + 0{,}0415 \times 1^2 + 0{,}0415 \times 1^2)$

$= 1/2 (0{,}351 + 0{,}083) = 0{,}217$ mol.dm^{-3}

5. ANNEXE
(fiche technique : le pHmètre)

5.1. Dispositif expérimental *(fig. 1.1.)*

Le pHmètre comprend :
– les électrodes : une électrode de mesure : électrode de verre, une électrode de référence ;
– un voltmètre.

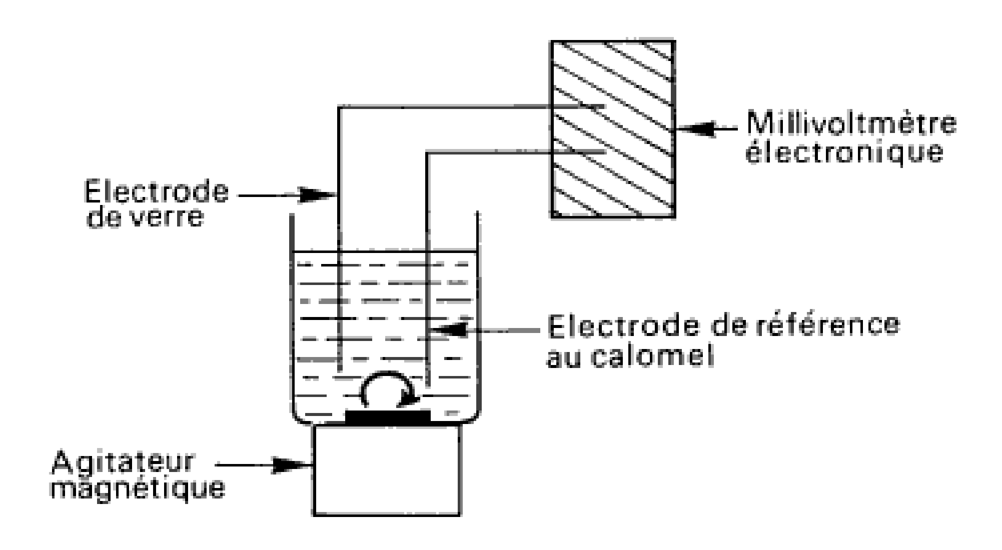


Fig. 1.1. Schéma du montage pour la détermination du pH par la méthode potentiométrique

5.1.1. Les électrodes *(fig. 1.2.)*

– *L'électrode de référence* est le plus souvent une électrode au calomel. La demi-pile formée : $Pt/Hg/Hg_2Cl_2/KCL$ a un potentiel constant (par rapport au potentiel standard d'une électrode à hydrogène) qui, pour une température donnée ne dépend que de la concentration en KCl. Si la solution en KCl est saturée : $E_{référence}$ = 0,247 V à 20 °C.

– *L'électrode de verre* : la partie active de l'électrode est la boule de verre remplie soit par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 mol.dm^{-3}, soit par une solution de KCl en tampon pH = 7.

Le conducteur interne et un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent.

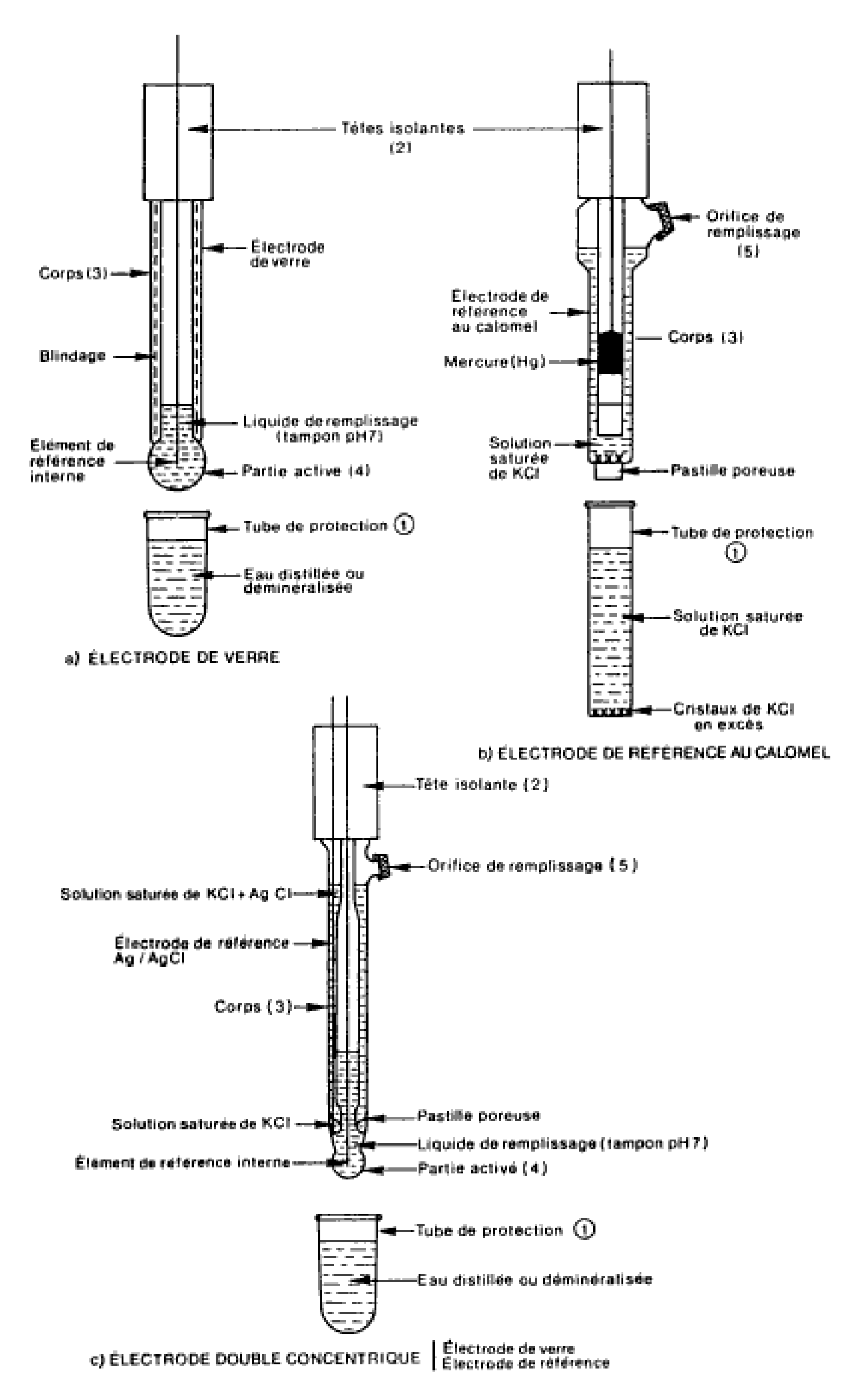


Fig. 1.2. Les électrodes de pHmétrie

Des ions Na^+ de la membrane de verre qui constitue l'extrémité de l'électrode de verre (épaisseur de 1/100 de mm à 1/10 de mm) vont s'échanger avec des ions hydronium (H_3O^+) contenus dans la solution aqueuse à doser. Le potentiel de la « membrane de verre sensible aux ions H_3O^+ » est une fonction affine du pH de la solution à doser.

La mesure du pH d'une solution revient à mesurer la différence de potentiel entre une électrode de mesure (électrode de verre) et une électrode de référence (électrode au calomel par exemple).

Le pH d'une solution aqueuse est défini en fonction de la force électromotrice **E** de la pile constituée par les deux électrodes.

$Ag/AgCl$, KClsat.H_3O+ / membrane de verre / solution dont on veut mesurer le pH / KClsat./$Hg/Hg2Cl_2$, KCl sat.

←———— électrode de verre ————→ ← pont de jonction → ← électrode de référence

Sa valeur est donnée par l'équation : $pH = pHe - \frac{(E - Es)F}{2,3026 \times R \times T}$

pHe = pH d'une solution étalon ;
Es = force électromotrice en présence de cette solution étalon ;
F = constante de Faraday ;
R = constante des gaz parfaits ;
T = température absolue.

A 20 °C $pH = pHe - \frac{(E - Es)}{0,058165}$

d'où : 0,058165 pH = 0,058165pHe – E + Es

soit : E = 0,058165 pHe + Es – 0,058165 pH

En schématisant, E est une fonction affine du pH du type E = A – B pH où A et B sont des constantes.

– *L'électrode double concentrique* : les deux électrodes – verre et référence sont combinées. L'électrode de référence correspond au couple argent – chlorure d'argent ($Ag/AgCl$) : le potentiel est imposé par le couple Ag^+/Ag. Il s'agit d'une électrode en argent en contact avec du chlorure d'argent et plongée dans une solution saturée en chlorure d'argent dont l'activité des ions chlorures est définie.

REMARQUE : le domaine optimal d'utilisation de l'électrode de verre ordinaire correspond à l'échelle de pH : $2 \leq pH \leq 11$.

Il existe des électrodes de verre conçues « pour milieu alcalin » (pH > 9), pour milieu riche en cations, pour un domaine de température déterminé.

5.1.2. Le voltmètre

La force électromotrice est mesurée après amplification car elle est très faible. Le pHmètre peut être analogique (cadran gradué en unités pH) ou numérique (affichage digital du pH).

5.2. Conseils d'utilisation

5.2.1. Mise en service des électrodes

Sortir chaque électrode de son tube de protection (1).

Rincer chaque électrode à l'eau distillée ou déminéralisée en prenant soin de ne pas mouiller la tête isolante (2).

Vérifier le niveau de la solution de remplissage de l'électrode de référence : il doit être situé à 5 mm environ au-dessous de l'orifice de remplissage (5). Remplir, si nécessaire, avec la solution appropriée :

– solution saturée de KCl pour les électrodes de référence au calomel ;

– solution saturée de KCl + AgCl pour les électrodes doubles concentriques dont l'électrode de référence est du type Ag/AgCl.

Placer l'électrode combinée ou les électrodes sur le support en résine acrylique et serrer modérément les vis de fixation à tête moletée. Ne pas fixer les électrodes au niveau du corps (3).

Si l'on utilise une électrode de verre et une électrode de référence indépendantes, prendre soin de placer l'électrode de verre en retrait (quelques millimètres plus haut), de manière à protéger sa partie active (4) par l'extrémité de l'électrode de référence.

5.2.2. Mesures au pHmètre

Avant toute mesure

Vérifier que le commutateur est sur la position « zéro ».
Relier l'appareil à une prise de terre.
Mettre l'appareil sous tension grâce à l'interrupteur.

Attendre 10 minutes.

Effectuer un réglage du zéro électrique : le commutateur étant sur la position « zéro », amener, à l'aide du potentiomètre « zéro », l'affichage ou l'aiguille du cadran sur la graduation « zéro » de l'échelle en millivolts.

Afficher éventuellement la température ambiante si le pHmètre le permet.
Brancher les électrodes au voltmètre.

Rincer les électrodes avec de l'eau distillée, soit par un jet d'eau distillée, soit en les plongeant dans un bécher rempli d'eau distillée.

Essuyer les électrodes avec du papier Joseph du haut vers le bas, sans choquer la membrane de verre.

Standardisation

Plonger les électrodes jusqu'à immersion complète de la boule de l'électrode de verre dans une solution tampon dont on connaît le pH.

Placer le commutateur sur la position « pH ». Puis, à l'aide du potentiomètre « standardisation », afficher (ou placer l'aiguille sur la graduation indiquant) la valeur exacte du pH de la solution tampon.

Placer à nouveau le commutateur sur la position « zéro ».

Retirer les électrodes de la solution tampon.

Rincer les électrodes à l'eau distillée.

Mesure du pH de la solution étudiée

Plonger les électrodes dans la solution à étudier.
Mettre le commutateur sur la position « pH ».
Lire directement sur le cadran, la valeur du pH.

Lorsque la mesure est terminée, ramener toujours le commutateur sur la position « zéro » avant de retirer les électrodes de la solution. Le commutateur doit être sur la position zéro entre deux séries de mesures de pH, sauf lors d'un dosage potentiométrique.

Il faut toujours rincer les électrodes et les essuyer au papier Joseph avant de les ranger dans les tubes de protection (1). L'électrode de verre est conservée dans de l'eau distillée ou déminéralisée et l'électrode au calomel dans une solution saturée de KCl.

6. EXERCICES

6.1. Mesure d'un pH. Calcul d'une concentration

Exercice n° 1 :

Calculer la concentration molaire en ions H_3O^+ d'un jus d'orange de pH = 3,5. Le pH étant mesuré à 0,05 unité près, donner la précision du calcul.

Exercice n° 2 :

Calculer le pH d'une eau minérale gazeuse dont la concentration en ions H_3O^+ est $3{,}2.\ 10^{-6}$ mol.dm^{-3} à 25 °C.

Exercice n° 3 :

Le pH du Coca-cola® est 2,5, le pH d'un vinaigre est 2,8 le pH d'un jus de citron 2,2.

– Quelle est la solution la plus acide ?

– Comment expliquer la différence de « goût acide » au niveau des papilles gustatives ?

– Quelle est la quantité (en mol) d'ions H_3O^+ présente dans un verre de 150 cm^3 de Coca-cola® ?

– Quelle est la quantité (en mol) d'ions H_3O^+ présente dans un verre de 150 cm^3 de jus de fruit préparé avec 50 cm^3 de jus de citron ? Calculer le pH de la boisson.

Exercice n° 4 :

Le pH sanguin d'un patient est de 7,41, mesuré à 37 °C. Calculer la concentration en moles d'ions H_3O^+ par dm^3 de sang analysé. Justifier le choix de la température de mesure.

La phosphatémie du patient étant de 1,20 $mmol.dm^{-3}$, calculer les concentrations plasmatiques molaires en ions hydrogénophosphates et dihydrogénophosphates $pK_A = 6,84$ à 37 °C.

Exercice n° 5 : pH d'une eau distillée

1) Compléter le tableau ci-contre donnant la variation du produit ionique de l'eau pure en fonction de la température :

Température en t °C	*1 / T T en degrés Kelvin (T = t °C + 273)*	*Produit ionique de l'eau : Ke*	*pKe*	*pH*	*[H_3O^+] $mol.dm^{-3}$*	*[OH^-] $mol.dm^{-3}$*
0		$0,11.\ 10^{-14}$				
10		$0,30.\ 10^{-14}$				
15		$0,45.\ 10^{-14}$				
20		$0,68.\ 10^{-14}$				
25		10^{-14}				
30		$1,48.\ 10^{-14}$				
35		$2,10.\ 10^{-14}$				
40		$2,95.\ 10^{-14}$				
50		$5,50.\ 10^{-14}$				
60		$9,55.\ 10^{-14}$				
70		$15,50.\ 10^{-14}$				
80		$25,10.\ 10^{-14}$				
90		$38,00.\ 10^{-14}$				
100		$55,00.\ 10^{-14}$				

2) Le produit ionique de l'eau est-il une fonction croissante ou décroissante de la température ?

3) Tracer la courbe pH = f(1/T)   T = t °C + 273.

4) Déterminer graphiquement :
– la température pour laquelle le pH de l'eau pure est égal à 7,2 ;
– le pH de l'eau pure à 37 °C.

5) Définir une solution acide, une solution basique, une solution neutre à 100 °C.

Calculer le pH d'une solution qui contient 10^{-11} mol d'ions hydroxyde par dm^{-3} à cette température.

6) Même question à t = 20 °C.

7) Le pH d'une eau distillée mesuré à 25 °C est de 5,4.
– Comment expliquer cette baisse du pH par rapport au pH de l'eau pure ?
– Peut-on considérer cette eau comme pure pour préparer des solutions ? Justifier.

Exercice n° 6 : la réserve alcaline et le pH du milieu intérieur (extrait sujet Bac)

1) Calculer pour un échantillon de sang artériel normal de pH = 7,42, le rapport de la concentration en ions hydrogénocarbonate à celle du dioxyde de carbone dissous dans le milieu sanguin (pK_A = 6,10).

2) L'addition d'un acide fort sur 10 cm^3 de ce même échantillon de sang libère 5,91 cm^3 de gaz dioxyde de carbone mesuré dans les conditions standards (0 °C et 101 396 pascals ou 760 mmHg).

Sachant que le volume molaire du dioxyde de carbone (gaz non parfait) est égal à 22,26 $dm^3.mol^{-1}$ lorsqu'il est mesuré dans les mêmes conditions, calculer le nombre de millimoles d'ions hydrogénocarbonates et de dioxyde de carbone dissous dans un dm^3 de sang.

6.2. Préparation d'une solution d'acide phosphorique

Sur l'étiquette d'une solution commerciale d'acide orthophosphorique (H_3PO_4), il est indiqué : densité 20/4 = 1,70 ; % en masse = 85.

1) Calculer la concentration molaire en moles d'acide phosphorique par dm^3 de solution commerciale.

2) Quel volume de cette solution faut-il prélever pour préparer 3 litres d'une solution d'acide phosphorique à environ 0,1 $mol.dm^{-3}$?

3) Comment préparer 1,5 dm^3 d'une solution d'acide phosphorique à 0,1 mol d'ions H_3O^+ par dm^3, à partir d'une solution d'acide phosphorique décimolaire.

4) Le pH d'une solution d'acide phosphorique à 0,1 mol d'ions H_3O^+ par dm^3 est de 1,1. Comment expliquer l'écart entre le pH théorique de cette solution : pH = – log [H_3O^+] = 1 et la valeur mesurée au pHmètre ?

Données : H = 1 $g.mol^{-1}$; P = 31 $g.mol^{-1}$; O = 16 $g.mol^{-1}$

6.3. Solutions tampons

Exercice n° 1 : préparation de deux solutions tampon phosphate

Première préparation : donner un protocole expérimental pour préparer 1 litre de solution tampon phosphate à 0,025 $mol.dm^{-3}$ pH 6,88 à 20 °C par pesées de monohydrogénophosphate de sodium dihydraté (Na_2HPO_4, $2H_2O$ M = 177,99 $g.dm^{-3}$) et de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4 M = 136,09 g mol^{-1}).

Quel sera le pH de la solution préparée, à 25 °C ?

Deuxième préparation : donner un protocole expérimental pour préparer 100 cm^3 de solution tampon phosphate pH = 7,40 à 20 °C, de force ionique 0,3 $mol.dm^{-3}$, à partir de solutions mères de monohydrogénophosphate de sodium dihydraté (Na_2HPO_4, $2H_2O$ M = 177,99 $g.dm^{-3}$) et de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4 M = 136,09 g. mol^{-1}).
Montrer que ce tampon est isotonique au plasma.

Données : pression osmotique plasmatique ≈ 800 kP_a à 20 °C ; R = 8,32 $J.mol^{-1}$ K^{-1} ; pK_A : 6,88 à 20 °C.

Exercice n° 2 : préparation d'une solution tampon ammoniacale pH 9,2

Donner trois protocoles expérimentaux pour préparer 50 cm^3 de tampon pH 9,2 à partir de solutions mères choisies parmi les solutions suivantes :
- solution d'ammoniac à 0,05 $mol.dm^{-3}$;
- chlorure d'ammonium à 0,06 $mol.dm^{-3}$;
- acide chlorhydrique à 0,10 $mol.dm^{-3}$;
- hydroxyde de sodium à 0,05 $mol.dm^{-3}$.

Données : pK_A du couple acide base $NH4^+$ / NH3 = 9,2 à 25 °C.

Exercice n° 3 : préparation d'une solution tampon acétate

Un litre de solution tampon acétate, pH 4,65 à 20 °C, peut être préparé à partir de 0,5 litre de chacune des solutions suivantes :
- solution aqueuse d'acide acétique à 0,4 $mol.dm^{-3}$;
- solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 0,2 $mol.dm^{-3}$.

Quelle est la concentration molaire du tampon préparé, en acide acétique et en acétate de sodium ?

Exercice n° 4 : préparation d'un tampon diéthanolamine–HCl (extrait sujet CAPET)

Comment procéder pour préparer 100 cm^3 de tampon diéthanolamine–HCL pH 9,5 à partir d'une solution d'HCl à 0,100 $mol.dm^{-3}$ et d'une solution aqueuse de diéthanolamine à 0,100 $mol.dm^{-3}$?

Quelle est sa concentration en diéthanolamine ?

Données : diéthanolamine : $NH(CH_2{-}CH_2OH)_2$ M = 105,14 $g.mol^{-1}$ pK_A = 8,88 à 25 °C.

Exercice n° 5 : tampon universel = Citrate – Phosphate – Borate – HCl

Les solutions tampons de pH compris entre 2 et 12 sont préparées à partir des solutions mères A et B.

Solution A :

- acide borique : $H - B(OH)_4$, 1,767 g ;
- acide citrique monohydraté, 6,004 g ;
- Véronal acide, 5,263 g ;
- dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), 3,888 g ;
- H_2O distillée q s p 1 dm^3.

Solution B : NaOH 0,2 $mol.dm^{-3}$.

1) Expliquer pourquoi ce tampon « universel » peut être utilisé sur l'échelle de pH : 2–12.

2) Ce tampon « universel » peut être utilisé pour étudier l'influence du pH sur l'activité d'une enzyme. Quel avantage apporte-t-il au mode opératoire ?

CORRECTION DES EXERCICES

6.1. Mesure d'un pH. Calcul d'une concentration

Exercice n° 1 :

$3{,}16 \times 10^{-4}$ mol H_3O^+ dm^{-3}

$3{,}45 \leq pH \leq 3{,}55$ $10^{-3{,}45} \leq [H_3O^+] \leq 10^{-3{,}55}$

$3{,}55 \times 10^{-4}\ mol.dm^{-3} \leq [H_3O^+] \leq 2{,}82 \times 10^{-4}\ mol.dm^{-3}$

Précision de la mesure $\frac{10^{-4}\,(3{,}55 - 2{,}82)}{3{,}16.10^{-4}} \times 100 = 23\ \%$ (valeur élevée due à la définition logarithmique du pH)

En tenant compte de la précision $[H_3O^+]$ retenue = $3{,}2.10^{-4}$ mol H_3O^+ dm^{-3}.

Exercice n° 2 :

Calcul pH = 5,49 ; mesure au pHmètre pH = 5,50.

Exercice n° 3 :

1) La solution la plus acide : le jus de citron.

2) Les acides ont une saveur « acide » généralement proportionnelle à la [H_3O^+]. Mais à concentration égale, les acides organiques ont une saveur plus acide que les acides minéraux (pénètrent plus rapidement au niveau des récepteurs du goût) et, parmi les acides organiques des produits alimentaires (acide citrique, acide tartrique, acide malique...), l'acide acétique, très corrosif, est celui qui a le caractère acide le plus marqué.

3) $4{,}75.10^{-4}$ mol H_3O^+.

4) $3{,}15.10^{-4}$ mol H_3O^+ ; pH 2,68.

Exercice n° 4 :

$[H_3O^+] = 3{,}89.10^{-8}$ mol.dm^{-3}

$$pH = pK_A + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \qquad \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 7{,}41 - 6{,}84 = 0{,}57$$

(1) $$\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 3{,}715$$

(2) $[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-] = 1{,}20$ mmol.dm^{-3}

De (1) et (2), on déduit : $[HPO_4^{2-}] = 0{,}95$ mmol.dm^{-3} et $[H_2PO_4^-] = 0{,}25$ mmol.dm^{-3}.

Exercice n° 5 :

1)

Température en t °C	*T (T = t °C + 273)*	*1 / T*	*Produit ionique de l'eau : Ke*	*pKe*	*pH 1/2 pKe*	*$[H_3O^+] = [OH^-]$ mol.dm^{-3} mol.dm^{-3}*
0	273	$3{,}66.10^{-3}$	$0{,}11.\ 10^{-14}$	14,96	7,48	$3{,}32.\ 10^{-8}$
10	283	$3{,}53.10^{-3}$	$0{,}30.\ 10^{-14}$	14,53	7,26	$5{,}48.\ 10^{-8}$
15	288	$3{,}47.10^{-3}$	$0{,}45.\ 10^{-14}$	14,34	7,17	$6{,}70.\ 10^{-8}$
20	293	$3{,}41.10^{-3}$	$0{,}68.\ 10^{-14}$	14,16	7,08	$8{,}25.\ 10^{-8}$
25	298	$3{,}35.10^{-3}$	10^{-14}	14,00	7,00	10^{-7}
30	303	$3{,}30.10^{-3}$	$1{,}48.\ 10^{-14}$	13,83	6,91	$1{,}22.\ 10^{-7}$
35	308	$3{,}25.10^{-3}$	$2{,}10.\ 10^{-14}$	13,68	6,84	$1{,}45.\ 10^{-7}$
40	313	$3{,}19.10^{-3}$	$2{,}95.\ 10^{-14}$	13,53	6,76	$1{,}72.\ 10^{-7}$
50	323	$3{,}09.10^{-3}$	$5{,}50.\ 10^{-14}$	13,26	6,63	$2{,}34.\ 10^{-7}$
60	333	$3{,}00.10^{-3}$	$9{,}55.\ 10^{-14}$	13,02	6,51	$3{,}09.\ 10^{-7}$
70	343	$2{,}91.10^{-3}$	$15{,}50.\ 10^{-14}$	12,80	6,40	$3{,}94.\ 10^{-7}$
80	353	$2{,}83.10^{-3}$	$25{,}10.\ 10^{-14}$	12,60	6,30	$5{,}00.\ 10^{-7}$
90	363	$2{,}75.10^{-3}$	$38{,}00.\ 10^{-14}$	12,42	6,21	$6{,}16.\ 10^{-7}$
100	373	$2{,}68.10^{-3}$	$55{,}00.\ 10^{-14}$	12,26	6,13	$7{,}42.\ 10^{-7}$

2) Fonction croissante.

4) pH = 7,20 pour $1/T = 3,5\ 10^{-3}$ t = 13 °C ; à 37 °C pH = 6,86.

5) T = 100 °C : solution acide : pH < 6,13 ; solution basique : pH > 6,13 ; solution neutre : pH = 6,13 ; pH = 1,26.

6) T = 20 °C : solution acide : pH < 7,08 ; solution basique : pH > 7,08 ; solution neutre : pH = 6,13 ; pH = 3,17.

7) Cette baisse de pH résulte de la dissolution de dioxyde de carbone provenant de l'air : cette présence de dioxyde de carbone et l'augmentation en ions H_3O^+ ($\approx 4\ 10^{-6}$ $mol.dm^{-3}$) sont négligeables pour la préparation de solutions.

Exercice n° 6 :

1) $$\log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]d} = 7,42 - 6,10 = 1,32 \qquad \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]d} = 20,89 \qquad (1)$$

2) $$[CO_2]d + [HCO_3^-] = \frac{5,91}{22,26 \times 10 \times 10^{-3}} = 26,55 \text{ mmol.dm}^{-3} \qquad (2)$$

De (1) et (2), on déduit $[CO_2]d = 1,21$ $mmol.dm^{-3}$ et $[HCO_3^-] = 25,34$ $mmol.dm^{-3}$.

6.2. Préparation d'une solution d'acide phosphorique

1) $$C_{H3PO4} = \frac{85}{98} \times \frac{1,70}{100} \times 10^3 \approx 15 \text{ mol.dm}^{-3}$$

2) Volume à prélever = (0,1/15) x 3 ≈ 0,020 dm^3 (éprouvette).

3) Il faut prélever 0,5 dm^3 de solution décimolaire puis compléter à 1,5 dm^3 avec de l'eau distillée.

4) Aux concentrations fortes en H_3O^+ la relation : $pH = -\log [H_3O^+]$ n'est plus valable.

6.3. Solutions tampons

Exercice n° 1 :

1. *Préparation* :

$$pH = pK_A \qquad \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 1 \qquad [HPO_4^{2-}] = [H_2PO_4^-] = 0,025 \text{ moldm}^{-3}$$

Peser m_{KH2PO4} = 136,09 · 0,025 = 3,40 g et $m_{Na2HPO4,\ 2\ H2O}$ = 177,99 · 0,025 = 4,45 g de produits préalablement desséchés pendant 2 heures à 110 – 130 °C.

Dissoudre et mettre en solution dans 1 litre d'eau distillée.

A 25 °C pH = 6,86.

2. Préparation :

$$\log\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 7,40 - 6,88 = 0,52 \qquad \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 3,31$$

Force ionique I = 0,3 = 1/2 $\sum (C_i \cdot Z_i^2)$

I = 1/2 ($[KH_2PO_4]$ ($1^2 + 1^2$) + $[Na_2HPO_4]$ ($2 \times 1^2 + 2^2$))

= $[KH_2PO_4]$ + 3$[Na_2HPO_4]$ = 0,3 mol.dm $^{-3}$

On en déduit que : $[KH_2PO_4]$ = 0,0275 mol.dm $^{-3}$; $[Na_2HPO_4]$ = 0,0910 mol.dm $^{-3}$.

Préparer par exemple, 2 solutions mères à 0,2 mol.dm $^{-3}$ en hydrogénophosphates : peser 1,361 g de KH_2PO_4 et 1,780 g de Na_2HPO_4, 2 H_2O produits préalablement desséchés pendant 2 heures à 110 – 130 °C. Dissoudre et mettre en solution dans 50 cm^3. Prélever 13,75 cm^3 de la solution KH_2PO_4 et 45,50 cm^3 de la solution Na_2HPO_4 q s p 100 cm^3.

La pression osmotique de cette solution tampon est :

Π = n/V · R T = (0,0275 x 2 + 0,091 x 3) x 10^3 x 8,32 x 293 x 10^{-3} = 800 kPa tampon isotonique au plasma.

Exercice n° 2 :

1) Demi-neutralisation de la solution de chlorure d'ammonium à 0,06 mol.dm $^{-3}$ par la solution d'hydroxyde de sodium à 0,05 mol.dm $^{-3}$.

Au pK_A = 9,2 $\quad n_{OH-\ versées} = 1/2\ n_{NH4+\ apportées\ par}\ E_{NH4+}$

$C_{OH-} \times E_{OH-} = 1/2\ C_{NH4+} \times E_{NH4+}$

$E_{OH-} / E_{NH4+} = 0,6$ (1)

Volume tampon $E_{OH-} + E_{NH4+} = 50\ cm^3$ (2)

De (1) et (2) on en déduit : E_{NH4+} = 31,25 cm^3 ; E_{OH-} = 18,75 cm^3.

Mode opératoire : apporter 18,75 cm^3 de solution d'hydroxyde de sodium à la burette (ou pipette graduée à 20 cm^3) puis q s p 50 cm^3 avec la solution de chlorure d'ammonium.

2) Demi-neutralisation de la solution d'ammoniac à 0,05 mol.dm $^{-3}$ par la solution d'acide chlorhydrique à 0,1 mol.dm $^{-3}$.

Au $pK_A = 9{,}2$ $n_{HCl - versées} = 1/2\ n_{NH3\ apportées\ par}\ E_{NH3}$

$C_{HCL} \times E_{HCl} = 1/2\ C_{NH3} \times E_{NH3}$

$E_{HCl} / E_{NH3} = 0{,}25$ (1)

Volume tampon $E_{HCl} + E_{NH3} = 50\ cm^3$ (2)

De (1) et (2) on en déduit : $E_{NH3} = 40\ cm^3$; $E_{HCL} = 10\ cm^3$.

Mode opératoire : mesurer $E_{HCL} = 10\ cm^3$ q s p 50 cm^3 avec la solution d'ammoniac.

3) Apporter $n_{NH3} = n_{NH4+}$ par la solution d'ammoniac à 0,05 $mol.dm^{-3}$ et par la solution de chlorure d'ammonium à 0,06 $mol.dm^{-3}$.

$C_{NH3} \times E_{NH3} = C_{NH4+} \times E_{NH4+}$

$E_{NH3} / E_{NH4+} = C_{NH4+} / C_{NH3} = 1{,}2$ (1)

Volume tampon $E_{NH3} + E_{NH4+} = 50\ cm^3$ (2)

De (1) et (2) on en déduit : $E_{NH4+} = 22{,}7\ cm^3$; $E_{NH3} = 27{,}3\ cm^3$.

Mode opératoire : mesurer $E_{NH4+} = 22{,}7\ cm^3$ q s p 50 cm^3 avec la solution d'ammoniac.

Exercice n° 3 : tampon acétate à 0,1 $mol.dm^{-3}$

La solution tampon est préparée en mélangeant volume à volume la solution d'acide acétique et la solution d'hydroxyde de sodium : demi-neutralisation de la solution d'acide acétique à 0,4 $mol.dm^{-3}$ par la solution d'hydroxyde de sodium à 0,2 $mol.dm^{-3}$.

A la demi-neutralisation :

$$C_{fAH} = C_{A-} = 1/2\ \ C_{iAH} = 1/2\ \ \frac{0{,}4 \cdot E_{AH}}{E_{AH+} + E_{OH-}} = 0{,}1\ mol.dm^{-3}$$

La solution tampon est décimolaire en acide acétique et en acétate de sodium.

Exercice n° 4 : tampon diéthanolamine

$$\text{H-N}(\text{CH}_2\text{–CH}_2\text{OH})_2 + H_3O^+ \rightleftharpoons H_2-\overset{+}{N}(\text{CH}_2\text{–CH}_2\text{OH})_2 + H_2O$$

A AH

$$\log \frac{[A]}{[AH]} = 9{,}5 - 8{,}88 = 0{,}62 \qquad \frac{[A]}{[AH]} = 4{,}168$$

$$\frac{[A]}{[AH]} = 4{,}168 = \frac{(0{,}1 \times E_A - 0{,}1 \times E_{HCl}) / E_A + E_{HCl})}{0{,}1\ \times E_{HCl} / (E_A + E_{HCl})} = \frac{E_A - E_{HCl}}{E_{HCl}}$$

$$\left.\begin{array}{l} E_A + E_{HCl} = 100\ cm^3 \\ \\ \dfrac{E_A - E_{HCl}}{E_{HCl}} = 4{,}168 \end{array}\right\} \quad \text{d'où : } E_{HCl} = 16{,}21\ cm^3 \text{ et } E_A = 83{,}79\ cm^3$$

Concentration de la solution tampon en diéthanolamine : $83{,}79 \times \dfrac{0{,}1}{100} = 0{,}084\ mol.dm^{-3}$.

Exercice n° 5 : tampon « universel »

– Les pK des diverses fonctions ionisables des constituants du tampon (pK_A : 3,13, 4,76, 6,40 pour l'acide citrique ; pK_A : 7,2 pour KH_2PO_4 ; pK_A : 9,20 pour l'acide borique) s'échelonnent régulièrement sur l'échelle de pH : 2-12 et vont pouvoir, en fonction du rapport solution A/solution B exercer un effet tampon jusqu'à 2 unités pH de part et d'autre du pK.

– Quel que soit le pH, ce sont les mêmes espèces ioniques qui sont mises en présence de l'enzyme ; seule la force ionique du milieu change au cours de l'étude de l'activité enzymatique en fonction du pH.



CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE OU CCM

SOMMAIRE

PAGE

Le but de cette manipulation est :
– de maîtriser une technique simple, rapide, efficace pour analyser un mélange ou vérifier la pureté d'un composé ;
– de dégager les différents temps d'une analyse chromatographique ;
– d'étudier l'influence de la structure d'une molécule sur le comportement chromatographique.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **phase stationnaire et phase mobile ;**
- **polarité d'un solvant ;**
- **phénomène d'adsorption ;**
- **chromatographie par développement ;**
- **R f ;**
- **témoins.**

1. PRINCIPE

La chromatographie sur couche mince est un exemple de chromatographie solide-liquide où le phénomène d'adsorption peut être considéré comme prédominant. Chaque soluté est soumis à deux forces :
– une force d'entraînement par adsorption sur l'adsorbant fixe polaire ;
– une force d'entraînement par l'éluant plus ou moins apolaire. L'éluant est composé d'un solvant vecteur peu polaire et peu visqueux et d'un solvant actif plus ou moins polaire dont il faut rechercher la proportion idéale pour obtenir une bonne séparation des solutés.

On *analysera* le comportement chromatographique, en prenant l'exemple du phénol et de ses dérivés, en fonction de la composition de l'éluent.

On *appliquera* la technique, en utilisant des témoins, à l'identification des acides aminés dans des milieux biologiques divers (jus de fruit, bouillon de viande...).

2. RÉACTIFS ET MATÉRIEL

2.1. Matériel de base

- Plaques de gel de silice à découper en fonction des dimensions souhaitées. Epaisseur 0,20 mm, format 20 x 20 cm. Référence Merck 5553.
- Plaques de gel de silice avec indicateur de fluorescence. Référence Merck 5554.
- Cuves :
  - standard pour plaques 20 x 20 cm et 20 x 10 cm. Référence Prolabo 06167005 ;
  - pour essai rapide : cuve chromajer pour plaque 20 x 5 cm. Référence Prolabo 06168008.
- A défaut, pots de confiture avec couvercle hermétique.
- Capillaires obtenus par étirement de pipettes Pasteur.
- Ampoules à décanter et support.
- Thermoventilateur.
- Gabarits pour dépôts 20 x 20 cm. Référence OSI A76245.00.

2.2. Pour la manipulation (1)

- Solutions :
  - solution de phénol à 5 g. dm^{-3} ;
  - solution d'orthonitrophénol à 2 g. dm^{-3} ;
  - solution de paranitrophénol à 5 g. dm^{-3}.
- Solvants : hexane et acétate d'éthyle (voir p. 29).
- Lampe UV 254/365 nm. Référence OSI A7641081 avec statif réf. OSI A7641084.

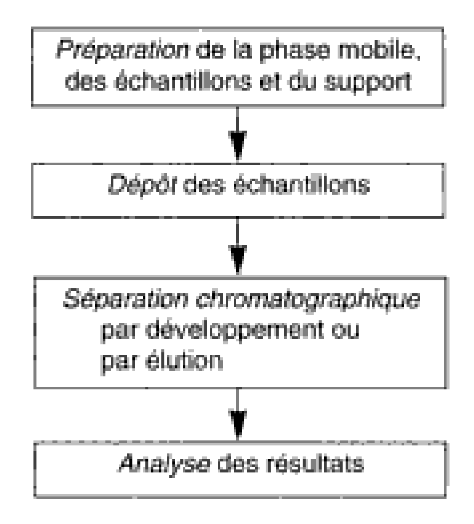
2.3. Pour la manipulation (2)

- Solutions :
  - Solutions à 2 $g.dm^{-3}$ de Proline, Arginine, Glycocolle, acide glutamique, Valine, Tyrosine ;
  - jus de citron, d'orange, de tomate... ;
  - extrait de tablettes de bouillon de bœuf ;
  - solution de ninhydrine à 1 g / cm^{-3} de butanol.
- Solvants : butanol, acide acétique (voir proportion p. 30).
- Pulvérisateur.

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Les différents temps

Toute séparation chromatographique analytique peut être schématisée par le diagramme suivant.



3.2. Procédures expérimentales

3.2.1. Préparation des solvants

– Opérer sous hotte ventilée.

– Préparer les mélanges en ampoule à décanter dans les proportions souhaitées, bien agiter et laisser reposer.

3.2.2. Préconditionnement

– De la plaque : laisser séjourner préalablement les plaques de gel de silice 15 minutes à l'étuve réglée à + 105 °C pour les réactiver.

– De la cuve : saturer pendant 30 minutes la cuve avec la phase mobile.

3.2.3. Préparation des plaques

– A 2 cm du bord inférieur, tracer finement au crayon une ligne en prenant soin de ne pas entamer la couche. Y indiquer les points de dépôt qui seront espacés d'environ 1 cm en laissant 2 cm aux extrémités pour éviter les effets de bords.

– Porter toutes les indications au crayon en haut de la plaque.
– Manipuler le moins possible la plaque avec les doigts pour éviter toute empreinte qui pourrait apparaître à la révélation.

3.2.4. Dépôts

Ils influencent beaucoup la qualité de la séparation. Le dépôt idéal est le plus petit possible car une diffusion de la migration est inévitable :
– en surface, pour éviter la superposition de spots peu séparés (on ne dépassera pas 3 mm de diamètre) ;
– en quantité, pour éviter de dépasser la capacité de charge de la couche mince.

La solution est déposée au moyen de capillaires très fins sur la plaque que l'on veillera à ne pas abimer, par petites quantités successives pour permettre au solvant de s'évaporer. On pourra accélérer l'évaporation entre deux dépôts en utilisant un thermoventilateur.

3.2.5. Développement

– Introduire la plaque dans la cuve saturée de vapeurs de solvants en la faisant plonger de 1 cm dans la phase mobile.

– Refermer la cuve et en contrôler l'étanchéité.

– Faire migrer la phase mobile jusqu'à 1 cm du haut de la plaque.

– Sortir la plaque et repérer au crayon la position du front du solvant.

3.2.6. Révélation après séchage de la plaque

– Soit directement par observation en lumière ultraviolette si la plaque renferme un indicateur de fluorescence ; les substances masquent cette fluorescence et les sports apparaissent sous forme de taches sombres.

– Soit après pulvérisation d'un réactif adéquat qui entraîne la formation d'un dérivé coloré. Veiller à réaliser une pulvérisation légère. Entourer chaque spot par un léger trait de crayon.

3.3. Manipulation (1) : analyse de composés aromatiques

• Préparer les phases mobiles suivantes :
– phase 1 : hexane-acétate d'éthyle 3V – 1V ;
– phase 2 : hexane-acétate d'éthyle 2V – 1V ;
– phase 3 : acétate d'éthyle pur.

• Déposer sur des miniplaques de 4/8 cm avec indicateur de fluorescence deux gouttes des solutions de phénol, paranitrophénol et orthonitrophénol.

• Laisser migrer.

• Entourer les spots jaunes dès la sortie de la plaque.

• Observer en lumière ultraviolette à 254 nm.

3.4. Manipulation (2) : séparation d'acides aminés

- Préparer la phase mobile butanol – acide acétique – eau 4V – 2V – 1V.
- Déposer deux gouttes des solutions témoins.
- Déposer une goutte des jus de fruit filtrés.
- Déposer une goutte de l'extrait de bouillon de viande obtenu de la manière suivante :

– peser 5 grammes d'une tablette de bouillon et faire une extraction avec 20 cm^3 d'eau ;
– filtrer l'extrait ;
– le décolorer par du noir animal.

4. EXPLOITATION DES RÉSULTATS

4.1. Calculer les Rf de tous les spots obtenus

4.2. Comparer le comportement chromatographique du phénol et de ses dérivés

Interpréter les résultats en fonction de la polarité de la phase mobile et de la structure des solutés.

4.3. Identifier les acides aminés présents dans les mélanges analysés et discuter les résultats obtenus

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Comment pourrait-on évaluer la limite de détection de la technique ?

Exercice n° 2 :

Le CCM permet de mettre au point des expériences chromatographiques réalisables sur colonne. Si on traite un mélange phénol, orthonitrophénol et paranitrohénol par chromatographie sur colonne en phase réverse (phase fixe apolaire et phase mobile polaire) quel sera l'ordre de sortie des solutés ?

Exercice n° 3 :

Comment peut-on réaliser une révélation spécifique de l'arginine, de la tyrosine, de la proline ? Une révélation des glucides, des lipides ?

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

Phénol, paranitrophénol puis orthonitrophénol.

Exercice n° 2 :

- Révélation spécifique de l'arginine : réaction de Sakaguchi.
- Révélation spécifique de la tyrosine : réaction de Gerngross.
- Révélation des glucides : réaction de Molisch.
- Révélation des lipides : fixation d'iode ou indicateur de fluorescence spécifique.

Exercice n° 3 :

Nombre de plateaux théoriques N

$$N = 16\left(\frac{\text{distance de migration}}{\text{largeur du spot}}\right)^2$$



ANALYSE D'UN CORPS GRAS PAR DÉTERMINATION DE SES INDICES

SOMMAIRE

PAGE

Le but de la manipulation est de caractériser un corps gras par la détermination de ses indices d'acide I_A, de saponification I_S, d'ester I_E, d'iode I_I.

Les corps gras – liquides, quand il s'agit des huiles (d'arachide, d'olive, de ricin, de lin...), – ou solides, quand il s'agit des beurres, des graisses et des margarines, sont des esters naturels : ils dérivent, pour la majeure partie d'entre eux du glycérol et de différents acides carboxyliques à longue chaîne carbonée appelés acides gras. Ce sont des *triglycérides* ou *triacylglycérols*.

Ainsi :

– la tributyrine (ou tributanoylglycérol) du beurre est un triester d'acide butanoïque et de glycérol ;

– la trioléine (ou trioléylglycérol) des huiles végétales est un triester d'acide oléique et de glycérol ;

– la tripalmitine (ou tripalmitoylglycérol) présente dans de nombreux corps gras est un triester d'acide palmitique et de glycérol ;

– la tristéarine (ou tristéaroylglycérol) qui est utilisée pour la fabrication des bougies est un triester d'acide stéarique et de glycérol.

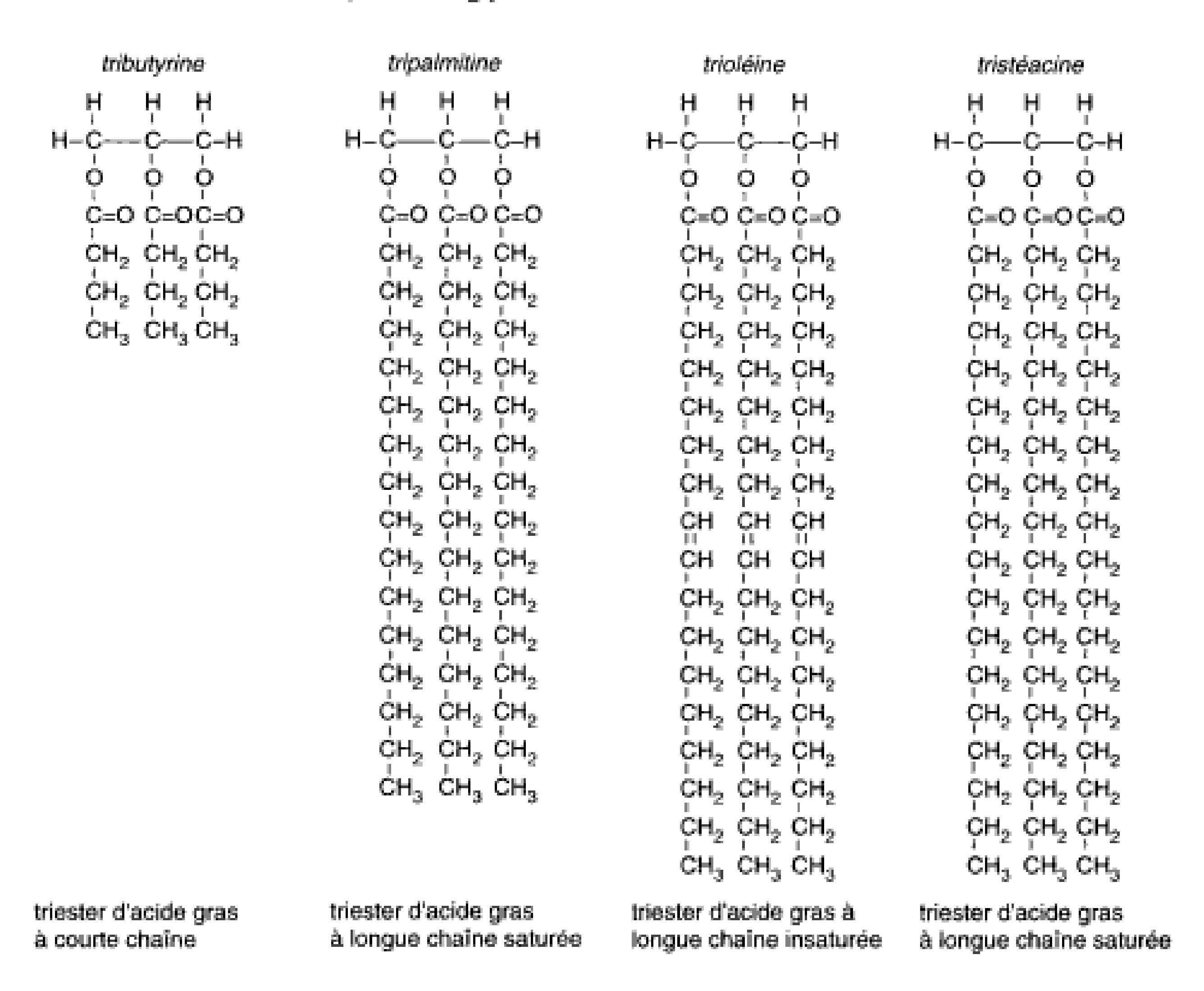


Fig. 3.1. Formules développées de triglycérides

Etude comparative de la composition en acides gras de 3 corps gras naturels de l'alimentation (d'après Lehninger) :

	% acides gras saturés / acides gras totaux				% acides gras insaturés / acides gras totaux
	C4–C12	C14	C16	C18	C16 + C18
Huile d'olive	< 2	< 2	13	3	80
Beurre	11	10	26	11	40
Graisse de bœuf	< 2	< 2	29	21	46

Ces corps gras sont des mélanges de triacylglycérols.

L'huile d'olive, riche en acides gras insaturés, est liquide à la température ordinaire, alors que, dans les mêmes conditions de température, la graisse de bœuf, riche en acides gras saturés, est solide et que le beurre, riche en acides gras à courtes chaînes, a une consistance molle.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **estérification ;**
- **saponification, hydrolyse ;**
- **masse molaire des triglycérides ;**
- **acides gras insaturés ;**
- **degré d'insaturation ;**
- **addition sur double liaison ;**
- **dosage des solutions d'iode par thiosulfate.**

Pour les dosages envisagés ci-dessous, il est important d'insister sur les consignes de sécurité à respecter pour le stockage et l'utilisation :
- **des produits corrosifs : KOH alcoolique ; réactif de Wijs ;**
- **des solvants organiques : effets toxiques liés à leur affinité pour les phospholipides du système nerveux (solvants : isobutanol-éthanol ; tétrachlorure de carbone) ; effets toxiques liés à leur pouvoir cancérogène en expérimentation animale en ce qui concerne le tétrachlorure de carbone.**

1. PRINCIPE

1.1. Indice d'acide I_A

Définition : l'indice d'acide d'un corps gras est la quantité de potasse exprimée en milligrammes, nécessaire pour neutraliser l'acidité contenue dans un gramme de corps gras.

La teneur en acides libres des corps gras (graisses, beurre, huiles) augmente avec le temps.

Principe de la mesure : l'indice d'acide est déterminé par dosage direct ou indirect, à l'aide de potasse alcoolique de concentration connue, le corps gras étant mis en solution dans un solvant organique à une concentration voisine de 40 $g.dm^{-3}$.

$$R-C\begin{matrix}/\!/O \\ \backslash OH\end{matrix} \quad + \quad OH^- \longrightarrow R-C\begin{matrix}/\!/O \\ \backslash O^-\end{matrix} \quad + \quad H_2O$$

acide gras — KOH en solution alcoolique — ion carboxylate

Le dosage direct a lieu en présence de phénolphtaléine : virage de l'incolore au rose. Mais la présence de la potasse alcoolique dans la burette constitue un inconvénient : rodage qui grippe rapidement.

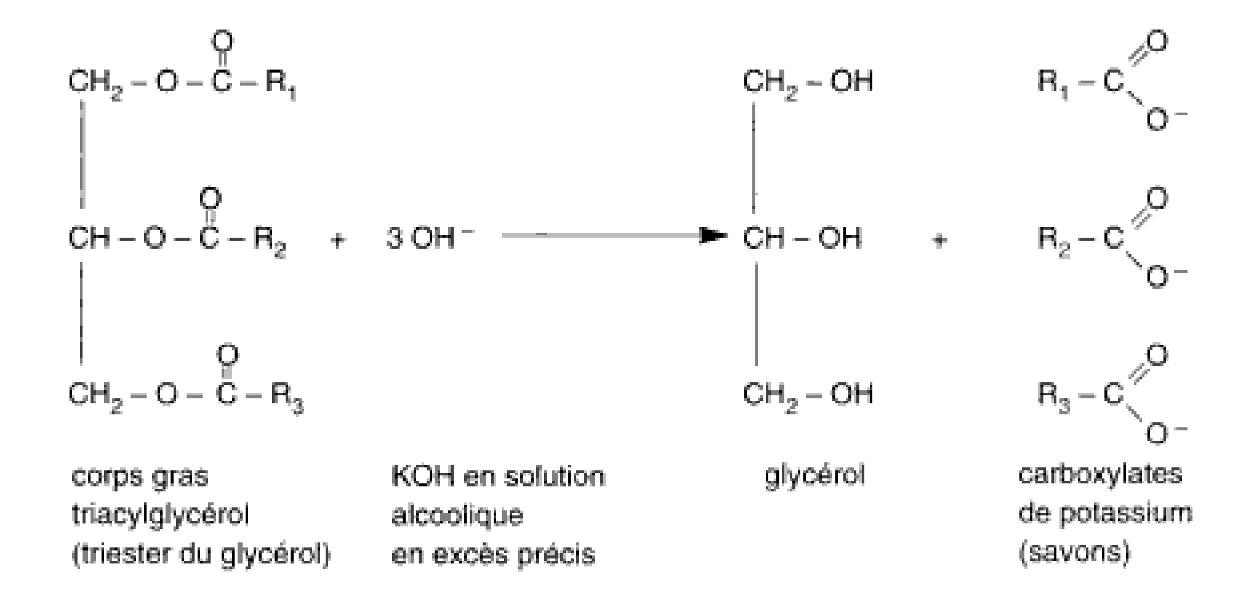
Lors d'un dosage indirect, le corps gras est dissous dans un excès précis de potasse alcoolique. L'excès est dosé par une solution d'acide chlorhydrique de concentration connue, en présence de phénolphtaléine : virage du rose à l'incolore.

1.2. Indice de saponification : I_S

Définition : l'indice de saponification d'un corps gras est la quantité de potasse exprimée en milligrammes, nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras combinés présents dans 1 gramme de ce corps gras.

REMARQUE : cette quantité varie nécessairement avec la masse molaire des acides gras constituant le corps gras : plus la masse molaire est élevée, plus l'indice de saponification est faible, et inversement. L'indice de saponification est donc une mesure indirecte de la masse molaire moyenne des acides gras du corps gras analysé.

Principe de la mesure : si l'on porte à ébullition m grammes d'un corps gras en présence d'un volume connu et en excès d'une solution étalonnée de potasse alcoolique, il se produit une saponification du corps gras :



La saponification des esters est une réaction totale (irréversible) ; lente à température ordinaire, elle a lieu en 30 à 60 minutes par chauffage à ébullition.

La potasse réagit avec les acides gras libres du corps gras et avec les acides gras libérés au cours de la saponification, pour former des savons.

En dosant par une solution d'acide chlorhydrique de concentration connue, et en présence de phénolphtaléine, la quantité de potasse non combinée, on peut connaître (dosage en retour), la quantité de potasse ayant réagi avec la matière grasse.

Estimation de l'altération des corps gras : l'altération des corps gras est fonction de leur structure chimique :
– les triacylglycérols qui les constituent, peuvent s'hydrolyser en donnant des di ou des mono-glycérides et des acides gras ;
– les chaînes insaturées des acides gras peuvent réagir avec l'oxygène de l'air pour donner des produits d'oxydation responsables du « rancissement » des corps gras.

L'acidification des corps gras peut avoir lieu avant leur production, par voie enzymatique (mauvais stockage des produits végétaux ou des tissus animaux d'origine). Elle peut se produire après leur conditionnement par hydrolyse chimique ou enzymatique.

Les acides gras libres ont un goût désagréable : par exemple = goût de « savon » des biscuits et gâteaux quand des acides gras à courte chaîne s'accumulent.

Les corps gras contiennent moins de 0,5 % d'acides gras libres. Dans certaines conditions, ces taux peuvent être multipliés par 10. Les corps gras ne doivent pas contenir plus de 1 % d'acides gras libres pour être comestibles.

L'altération d'un corps gras peut être estimée par le calcul du pourcentage $\frac{I_A}{I_S} \times 100$.

1.3. Indice d'ester : I_E

Définition : l'indice d'ester d'un corps gras est la quantité de potasse exprimée en milligrammes, nécessaire pour saponifier les acides gras combinés présents dans un gramme de corps gras : $\mathbf{I_E = I_S - I_A}$.

1.4. Indice d'iode : I_I

Définition : l'indice d'iode d'un corps gras est la masse d'iode, exprimée en grammes, que l'on peut fixer sur 100 grammes de ce corps gras.

L'indice d'iode est une mesure de l'insaturation du corps gras. En effet, seuls les composés insaturés sont susceptibles de fixer l'iode par addition. Cet indice augmente en même temps que la proportion des acides gras non saturés. L'indice d'iode est constant pour une matière grasse donnée.

Principe de la mesure : le diiode I_2 se fixe lentement sur les doubles liaisons. A l'inverse, les composés halogénés de l'iode réagissent rapidement.

Méthode de Wijs : le réactif utilisé est du chlorure d'iode en solution dans de l'acide acétique. Présence de catalyseurs : acétate mercurique par exemple.

Le lipide est en solution dans un solvant organique qui ne doit pas réagir avec le réactif de Wijs.

Consignes de sécurité

En raison de la très grande toxicité du tétrachlorométhane ou tétrachlorure de carbone : CCl_4, par inhalation, ingestion ou contact cutané, il est fortement recommandé de ne pas utiliser ce solvant organique pour solubiliser les graisses et les huiles et de le remplacer par un solvant moins toxique : fluorocarbone 113, trichloro-1, 1, 1 éthane ou cyclohexane (d'après document Merck).

- *Fixation de l'iode*

ICl se fixe sur les doubles liaisons des acides gras, selon la réaction :

$$R-CH=CH-R' + \underset{\text{Chlorure d'iode en excès}}{ICl} \longrightarrow R-\underset{\substack{| \\ I}}{CH}-\underset{\substack{| \\ Cl}}{CH}-R'$$

Le réactif de Wijs est apporté en excès pour que la réaction soit totale.

L'excès de ICl réagit ensuite avec de l'iodure de potassium (KI) pour former du diiode suivant la réaction :

$$\underset{\text{ion iodure}}{I^-} + ICl \longrightarrow I_2 + Cl^-$$

KI est ajouté en excès (éprouvette) afin de solubiliser le diiode formé, insoluble dans l'eau.

On dose l'excès d'ICl sous forme de diiode.

L'addition d'une mole de ICl sur une double liaison des acides gras équivaut ainsi à l'addition d'une mole de diiode.

- *Réalisation d'un témoin*

Il faut faire la mesure du diiode formé lors de l'addition de KI au réactif de Wijs :
- en présence *(dosage proprement dit)* de matière grasse ;
- en absence *(témoin)* de matière grasse.

Il est ensuite facile de calculer, par différence, la quantité de diiode qui a été fixé par la matière grasse.

- *Dosage du diiode libéré après addition de l'iodure de potassium (KI)*

Le diiode (I_2) présent dans l'erlenmeyer du dosage et dans l'erlenmeyer du témoin est dosé par une solution de thiosulfate de sodium (étalonné préalablement par un produit pur pour analyses : $K_2Cr_2O_7$ ou KIO_3 en milieu acide) :

Réduction du diiode : $I_2 + 2\,e^- \longrightarrow 2\,I^-$

Oxydation du thiosulfate : $2\,S_2O_3^{2-} \longrightarrow S_4O_6^{2-} + 2\,e^-$

Bilan : $I_2 + 2\,S_2O_3^{2-} \longrightarrow 2\,I^- + S_4O_6^{2-}$

($S_2O_3^{2-}$: ion thiosulfate ; $S_4O_6^{2-}$: ion tétrathionate)

Au cours du dosage, la solution de diiode dans KI se décolore progressivement, le diiode étant réduit par le thiosulfate (solution brune → jaune de plus en plus pâle → incolore).

A la fin du dosage, c'est-à-dire à l'équivalence, les deux phases doivent être incolores. Il n'est pas nécessaire d'ajouter de l'empois d'amidon ou du thiodène, en fin de dosage.

2. RÉACTIFS

- *Potasse alcoolique* à la concentration voisine de 0,2 $mol.dm^{-3}$ (à préparer extemporanément) :
- KOH pure pour analyses en pastilles (dissoudre dans le minimum d'eau) : 13 g ;
- éthanol q s p : 1 000 cm^3.

- *Corps gras à analyser* (indice d'acide ; indice de saponification) :
- corps gras (trioléine huile d'olive vierge...) : 40 g ;
- isobutanol-éthanol (volume à volume) q s p : 1 000 cm^3.

- *Phénolphtaléine :* $C_{20}H_{l4}O$: O_{x0} – 1 bis (hydroxy – 4 phényl) – 3,3 phtalanne. (Masse molaire = 318,21 $g.mol^{-1}$, soit 100 mg = 0,315 mmol).

Préparation d'une solution à 1 g.dm $^{-3}$ *(normes AFNOR)* : dissoudre, en agitant, 0,25 g d'indicateur en poudre dans de l'éthanol (95 % v/v) à la témpérature ambiante. Amener le volume à 200 cm^3 environ avec de l'éthanol et ajouter 0,2 cm^3 d'une solution d'acide acétique de concentration molaire voisine de 1 $mol.dm^{-3}$ (cette addition permet d'éviter le rosissement de la solution conservée dans des flacons en verre). Compléter le volume à 250 cm^3 avec de l'éthanol et homogénéiser.

- *Solution d'acide chlorhydrique* de concentration molaire voisine de 0,2 $mol.dm^{-3}$.
- *Solvant isobutanol-éthanol* (volume à volume).
- *Réactifs de Wijs :* réactif commercialisé, prêt à l'emploi.
- *Solution d'iodure de potassium* à 100 $g.dm^{-3}$.
- *Thiosulfate de sodium* à la concentration molaire voisine de 0,2 $mol.dm^{-3}$.
- *Tétrachlorure de carbone ou solvant de remplacement.*

3. MODE OPÉRATOIRE

Le corps gras à analyser est :
– en solution, à la concentration de 40 $g.dm^{-3}$, dans un solvant isobutanol-éthanol pour la détermination de $\mathbf{I_A}$ et $\mathbf{I_S}$;
– à l'état pur pour la détermination de $\mathbf{I_I}$.

3.1. Indice d'acide : I_A

3.1.1. Essai

Dans un erlenmeyer de 150 cm^3, introduire :

– E_1 = 10 cm^3 de KOH alcoolique de concentration molaire voisine de 0,2 $mol.dm^{-3}$ (poire d'aspiration) ;

– E = 10 cm^3 de solution de corps gras à la concentration de 40 $g.dm^{-3}$ dans du solvant isobutanol-éthanol (poire d'aspiration) ;

– 2 gouttes de phénolphtaléine.

Doser par une solution d'acide chlorhydrique de concentration molaire voisine de 0,2 mol.dm^{-3}, en agitant constamment, jusqu'à décoloration stable pendant une trentaine de secondes. Utiliser une semi-microburette (capacité 10 cm^3, subdivisions 0,05 cm^3).

REMARQUE : éviter le stockage individuel de KOH alcoolique afin de limiter la carbonatation du réactif.

3.1.2. Témoin

Dans un erlenmeyer de 150 cm^3, introduire :
- E_2 = 10 cm^3 de KOH alcoolique (poire d'aspiration) ;
- E = 10 cm^3 de solvant isobutanol-éthanol (éprouvette) ;
- 2 gouttes de phénolphtaléine.

3.2. Indice de saponification : I_S

La saponification est réalisée dans un « ballon à saponification » : ballon surmonté d'un réfrigérant à air de 1 m de hauteur, monté par rodage ou par bouchon caoutchouc (ne pas utiliser de graisse de rodage).

3.2.1. Essai

Dans un ballon à saponification, introduire :
- E_3 = 20 cm^3 de potasse alcoolique de concentration molaire voisine de 0,2 mol.dm^{-3} (poire d'aspiration) ;
- E = 10 cm^3 de solution de corps gras à la concentration de 40 g.dm^{-3} dans du solvant isobutanol-éthanol (poire d'aspiration),

Adapter et fixer le réfrigérant à air,
Porter au bain-marie (≈ 100 °C) pendant 45 mn,
Agiter fréquemment,
Les vapeurs de solvant doivent se condenser dans la moitié inférieure de la canne de verre ;
- Ajouter 2 gouttes de phénolphtaléine.

Doser par la solution d'acide chlorhydrique de concentration voisine de 0,2 mol.dm^{-3}, en agitant constamment jusqu'à décoloration stable pendant une trentaine de secondes.

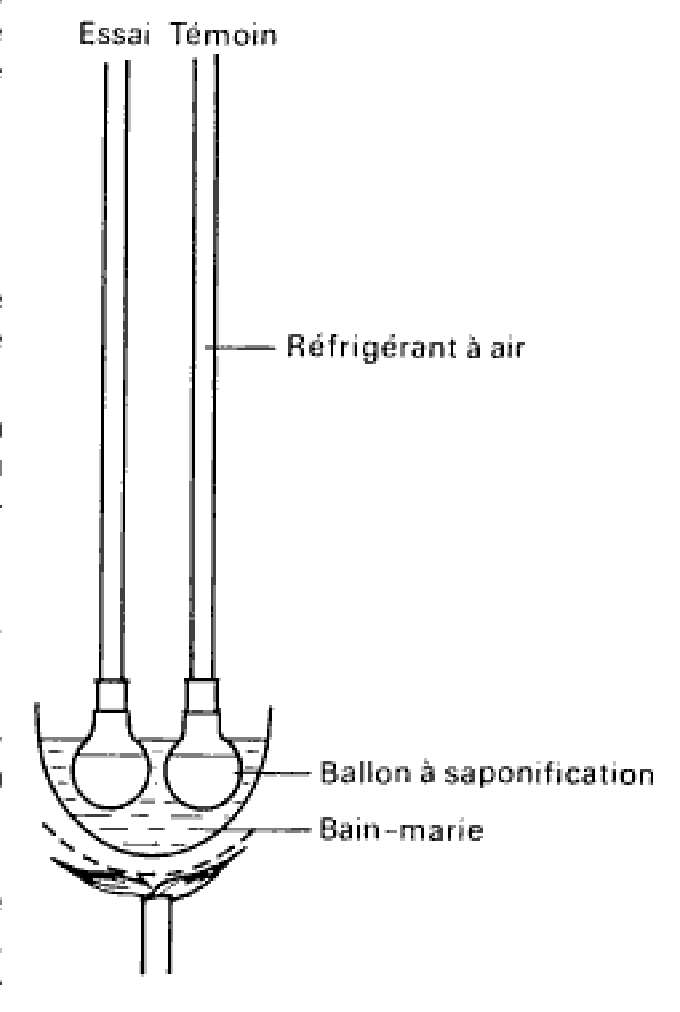


Fig. 3.2. Schéma du montage d'une saponification

3.2.2. *Témoin*

Opérer rigoureusement dans les mêmes conditions que l'essai :

– E_4 = 20 cm^3 de potasse alcoolique de concentration molaire voisine de 0,2 $mol.dm^{-3}$ (poire d'aspiration) ;

– E = 10 cm^3 de solvant isobutanol-éthanol (poire d'aspiration).

3.3. Indice d'iode : I_I

3.3.1. *Essai*

Dans un tube à peser, peser une masse exacte, voisine de 0,2 g de corps gras à analyser.

Dans une fiole d'erlenmeyer *bouchant émeri*, introduire :
– le tube à peser contenant le corps gras ;
– 20 cm^3 de tétrachlorure de carbone ou d'un autre solvant (éprouvette).

Consignes de sécurité

– Travailler sous la hotte à aspiration.
– Refermer immédiatement la fiole d'erlenmeyer et le flacon de solvant.
– Eviter toute inhalation.
– Eviter tout contact avec la peau et les yeux (usage éventuellement de gants ; port de lunettes de protection obligatoire).
– Travailler loin de toute source de chaleur.
– Ne pas rejeter à l'évier les solutions de travail contenant du tétrachlorure de carbone ou un autre solvant de remplacement. Rassembler ces solutions dans des récipients métalliques clos et étanches étiquetés (cf. flacons de récupération Merck...).

Agiter, en évitant toute projection sur le bouchon, pour dissoudre le corps gras dans le solvant.

Ajouter : E_1 = 20 cm^3 de réactif de Wijs (poire d'aspiration).

Maintenir la fiole d'erlenmeyer bouchée, à l'obscurité pendant 20 à 30 minutes, en agitant de temps en temps.

Ajouter 100 cm^3 d'eau distillée.

Ajouter 20 cm^3 de KI à 100 $g.dm^{-3}$.

Doser le diiode formé, par une solution de thiosulfate de concentration molaire connue, voisine de 0,2 $mol.dm^{-3}$.

Entre deux apports de la solution de thiosulfate versée à la burette, boucher la fiole d'erlenmeyer et agiter énergiquement afin de former une émulsion entre les deux phases en présence (phase aqueuse supérieure et phase organique inférieure). Il faut extraire le diiode qui se concentre dans le tétrachlorure de carbone ou le solvant de remplacement.

En fin de réaction, les deux phases doivent être incolores. L'emploi de thiodène est inutile.

3.3.2. Témoin

Opérer d'une manière rigoureusement identique.

Dans une fiole d'erlenmeyer bouchant émeri, introduire :
– 20 cm^3 de tétrachlorure de carbone ;
– E_2 = 20 cm^3 de réactif de Wijs.

3.4. Questions

1) Déterminer, à partir des résultats expérimentaux obtenus, les indices du corps gras analysé : $\mathbf{I_A}$; $\mathbf{I_S}$; $\mathbf{I_I}$.

2) A partir de l'indice de saponification ($\mathbf{I_S}$) et de l'indice d'acide ($\mathbf{I_A}$), déduire l'indice : $\mathbf{I_E}$.

3) Conclure sur la nature du corps gras analysé.

– Le corps gras est-il pur ? Calculer, éventuellement, le pourcentage de moles d'acides gras libres pour 100 moles d'acides gras libres et estérifiées : ($\mathbf{I_A}$ / $\mathbf{I_S}$) **x 100**.

– Si le corps gras est un triglycéride mixte : calculer la masse molaire du triglycéride analysé. Calculer le nombre de doubles liaisons par mole d'acide gras.

– Si le corps gras est un triglycéride simple : calculer les masses molaires du triglycéride et de son acide gras. Calculer le nombre de doubles liaisons par mole d'acide gras. Donner la formule moléculaire du triglycéride.

4. TECHNIQUE : calculs

Les concentrations C sont exprimées en $mol.dm^{-3}$ et les volumes en cm^3

4.1. Détermination de l'indice d'acide : I_A

Témoin à l'équivalence :

$$n_{OH^- \text{ apportées par E2(KOH)}} = n_{H3O^+ \text{ apportées par HCl}}$$

$$C_{OH^-} \times E_2 \times 10^{-3} = C_{H3O^+} \times V_{TH3O^+} \times 10^{-3}$$

$$C_{OH^-} = \frac{C_{H3O^+} \times V_{TH3O^+}}{E_2}$$

Dosage à l'équivalence :

$$n_{OH^- \text{ combinées au corps gras}} = n_{OH^- \text{ apportées par E1 (KOH)}} - n_{OH^- \text{ en excès}}$$

$$n_{OH^- \text{ combinées au corps gras}} = 10^{-3}\,(C_{OH^-} \times E_1 - C_{H3O^+} \times V_{DH3O^+})$$

$$n_{OH^- \text{ combinées au corps gras}} = 10^{-3}\left(\frac{C_{H3O^+} \times V_{TH3O^+}}{E_2} \times E_1 - C_{H3O^+} \times V_{DH3O^+}\right)$$

$$n_{OH^- \text{ combinées au corps gras}} = 10^{-3} \times C_{H3O^+}\left(\frac{E_1}{E_2} \times V_{TH3O^+} - V_{DH3O^+}\right)$$

$$I_A = C_{H3O^+}\left(\frac{E_1}{E_2} \times V_{TH3O^+} - V_{DH3O^+}\right)\frac{M_{KOH} \cdot 10^3}{E \times 40}$$

$$\mathbf{I_A} = C_{H3O^+}\,(V_{TH3O^+} - V_{DH3O^+})\,\frac{M_{KOH}}{0{,}4}$$

Pour $M_{KOH} = 56{,}1\ g.mol^{-1}$

$$\mathbf{I_A} = \frac{56{,}1}{0{,}4}\,C_{H3O^+}\,(V_{TH3O^+} - V_{DH3O^+})$$

4.2. Détermination de l'indice de saponification : I_S

Témoin à l'équivalence :

$$n_{OH^- \text{ apportées par E4(KOH)}} = n_{H3O^+ \text{ apportées par HCl}}$$

$$C_{OH^-} \times E_4 \times 10^{-3} = C_{H3O^+} \times V_{TH3O^+} \times 10^{-3}$$

$$C_{OH^-} = \frac{C_{H3O^+} \times V_{TH3O^+}}{E_4}$$

Dosage à l'équivalence :

$$n_{OH^- \text{ combinées aux acides gras}} = n_{OH^- \text{ apportées par E3 (KOH)}} - n_{OH^- \text{ en excès}}$$

$$n_{OH^- \text{ combinées aux acides gras}} = 10^{-3}\,(C_{OH^-} \times E_3 - C_{H3O^+} \times V_{DH3O^+})$$

$$n_{OH-\text{ combinées aux acides gras}} = 10^{-3}\left(\frac{C_{H3O+} \times V_{TH3O+}}{E_4} \times E_3 - C_{H3O+} \times V_{DH3O+}\right)$$

$$n_{OH-\text{ combinées aux acides gras}} = 10^{-3} \times C_{H3O+}\left(\frac{E_3}{E_4} \times V_{TH3O+} - V_{DH3O+}\right)$$

$$I_S = C_{H3O+}\left(\frac{E_3}{E_4} \times V_{TH3O+} - V_{DH3O+}\right)\frac{M_{KOH} \cdot 10^3}{E \times 40}$$

$$\mathbf{I_S} = C_{H3O+}(V_{TH3O+} - V_{DH3O+})\frac{M_{KOH}}{0,4}$$

Pour $M_{KOH} = 56,1\ g.mol^{-1}$

$$\mathbf{I_S} = \frac{56,1}{0,4} C_{H3O+}(V_{TH3O+} - V_{DH3O+})$$

Détermination de la masse molaire du corps gras s'il s'agit d'un triglycéride :

Nombre de moles de KOH ayant saponifié 1 g de triglycéride : $\frac{10^{-3} \times \mathbf{I_S}}{56,1}$

D'après l'équation de saponification $n_{OH-} = 3n_{\text{triglycéride}}$,

Nombre de moles de triglycéride correspondant à un gramme de produit : $\frac{10^{-3} \times \mathbf{I_S}}{3 \times 56,1}$

Masse d'une mole de triglycéride ($M\ g.mol^{-1}$) : $\frac{3 \times 56,1}{10^{-3} \times \mathbf{I_S}}$

4.3. Indice d'iode : I_I

– Dans ce dosage : une mole de chlorure d'iode correspond à une mole de diiode, d'où : $n_{ICL} = n_{I_2}$ et $C_{ICL} = C_{I_2}$

– D'autre part, d'après l'équation de réduction du diiode par le thiosulfate :

$$n_{I_2} = 1/2\ n_{S2O3^{2-}}$$

Témoin : $n_{I_2\text{ dosées}} = 1/2\ n_{S2O3^{2-}}$

$$C_{ICL} \times E_{2ICL} \times 10^{-3} = 1/2\ C_{S2O3^{2-}} \times V_T \times 10^{-3}$$

$$\text{d'où : } C_{ICL} = 1/2\ C_{S2O3^{2-}} \times \frac{V_T}{E_{2ICL}}$$

Dosage :

$$n_{I2 \text{ fixées par le corps gras}} = n_{ICL \text{ apportées par E1}} - n_{I2 \text{ dosées par } S_2O_3^{2-}}$$

$$n_{I2 \text{ fixées par le corps gras}} = 10^{-3}\,(C_{ICL} \times E_{1ICL} - 1/2\ C_{S_2O_3^{2-}} \times V_D)$$

$$n_{I2 \text{ fixées par le corps gras}} = 10^{-3}\,(1/2\ C_{S2O3^{2-}} \times V_T \times \frac{E1_{ICL}}{E_{2ICL}} - 1/2\ C_{S2O3^{2-}} \times V_D)$$

$$\mathbf{I}_I = m_{gI2 \text{ fixées par 100 g de corps gras}} = 10^{-3} \times 1/2\ C_{S2O3^{2-}} (V_T - V_D) \times M_{I2} \times \frac{100}{m_g}$$

$$\mathbf{I}_I = 12{,}7 \times \frac{C_{S2O3^{2-}}}{m_g} (V_T - V_D)$$

L'indice d'iode $\mathbf{I}_I$ permet de calculer le nombre de doubles liaisons par molécule d'acide gras (soit M $g.mol^{-1}$, la masse molaire du corps gras pur).

Le nombre de moles de diiode (n_{I2}) fixées sur 100 g de corps gras pur est :

$$n_{I2} = \frac{\mathbf{I}_I}{M_{I2}}$$

Le nombre de moles de diiode fixées sur une mole de corps gras pur est égal au nombre de doubles laisons (n_Δ) présentes par mole de corps gras ; soit :

$$n_\Delta = \frac{\mathbf{I}_I \times M}{254 \times 100}$$

5. EXERCICES

Exercice n° 1 : calcul des indices

Calculer les indices d'acide $\mathbf{I_A}$, de saponification $\mathbf{I_S}$, d'ester $\mathbf{I_E}$ et d'iode $\mathbf{I_I}$ des corps gras suivants :

– acide linolénique : $CH_3–CH_2–CH=CH–CH_2–CH=CH–CH_2–CH=CH–(CH_2)$ 7–C00H (M = 278 $g.mol^{-1}$)

– acide stéarique : CH_3– (CH_2)16–C00H (M = 284 $g.mol^{-1}$)

– tripalmitine : (M = 806 $g.mol^{-1}$)

```
      O
      ||
CH2–O–C–(CH2)14–CH3
 |    O
 |    ||
CH–O–C–(CH2)14–CH3
 |    O
 |    ||
CH2–O–C–(CH2)14–CH3
```

– linoléate de cholestérol : cholestérol M = 387 $g.mol^{-1}$; acide linoléique M = 280 $g.mol^{-1}$.

Exercice n° 2 : détermination de la formule moléculaire d'un triglycéride simple et pur

On a déterminé l'indice de saponification d'un triglycéride : $\mathbf{I_S}$ = 190.

Déterminer les masses molaires de ce triglycéride et de son acide gras.

Donner la formule moléculaire de ce triglycéride.

Exercice n° 3 : détermination de la formule moléculaire d'un triglycéride pur et optiquement inactif

A partir des résultats expérimentaux suivants, déterminer la structure et nommer le triglycéride analysé :

1) On traite 3,552 g du triglycéride par 20 cm^3 d'une solution de potasse alcoolique de concentration molaire égale à 1 $mol.dm^{-3}$, pendant une heure, au bain-marie.
L'excès de potasse alcoolique est dosé par 8 cm^3 d'une solution H_2SO_4 de concentration molaire égale à 0,5 $mol.dm^{-3}$.
En déduire la masse molaire (M $g.mol^{-1}$) du triglycéride.

2) On traite 4,44 g du triglycéride par 10 cm^3 d'une solution d'iode de concentration molaire égale à 1 $mol.dm^{-3}$.
Le diiode en excès est dosé par 10 cm^3 d'une solution de thiosulfate à la concentration molaire de 1 $mol.dm^{-3}$.
En déduire le nombre de doubles liaisons (n_{Δ}).

A partir des résultats expérimentaux suivants, proposer une structure pour le triglycéride analysé.

Exercice n° 4 : estimation de l'altération d'une matière grasse

1) 5 g de matière grasse nécessitent 5,5 cm^3 de potasse alcoolique à 0,5 $mol.dm^{-3}$ pour neutraliser les acides gras libres.

2) 1 g de matière grasse, nécessite, d'autre part, 11,3 cm^3 de potasse alcoolique à 0,5 $mol.dm^{-3}$ pour neutraliser les acides gras libres et saponifier les acides gras combinés.
Exprimer les indices d'acide $\mathbf{I_A}$, de saponification $\mathbf{I_S}$ et d'ester $\mathbf{I_E}$ de la matière grasse analysée. Calculer le pourcentage d'acides gras libres. Cette matière grasse est-elle comestible ?

Exercice n° 5 : analyse d'un triglycéride (BAC)

L'indice de saponification d'un triglycéride pur est égal à 196 et son indice d'iode à 59.
L'analyse chromatographique de ses acides gras constitutifs révèle qu'il s'agit d'acide palmitique et d'acide oléique.
Déterminer la masse molaire du triglycéride et sa structure.

Données : I = 127 $g.mol^{-1}$; K = 39,1 $g.mol^{-1}$; O = 16 $g.mol^{-1}$; H = 1 $g.mol^{-1}$; C = 12 $g.mol^{-1}$.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

	$I_A = \frac{56\,100}{M_{corps\ gras}}$	$I_S = \frac{n_{l\ ester} \times 56\,100}{M_{corps\ gras}}$	$I_E = I_S - I_A$	$I_I = \frac{n_\Delta \times 254}{M_{corps\ gras}} \times 100$
acide linolénique	202	202	0	274
acide stéarique	198	198	0	0
tripalmitine	0	209	209	0
linoléate de cholestérol : M = 649 $g.mol^{-1}$; (3_Δ)	0	86	86	117

$n_{l\ ester}$: nombre de liaisons ester présentes dans le lipide.

Exercice n° 2 :

$$M_{triglycéride} = \frac{n_{l.ester} \times 56\,100}{190} = 886\ g.mol^{-1}$$

$M_{triglycéride} = (3 \times M_{acide\ gras} + M_{glycérol} - 3 \times M_{H20}) = (3 \times M_{acide\ gras} + 92 - 54) =$ 886 g.mol^{-1}

$M_{acide\ gras}$ = 282 g.mol^{-1}. Il s'agit de la trioléine.

Exercice n° 3 :

$$n_{triglycéride} \text{ dans 3,552 g de matière grasse} = \frac{(20 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-3} \times 0,5 \times 2)}{3}$$

$$M_{triglycéride} = \frac{3,552 \times 3}{(20 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-3} \times 0,5 \times 2)} = 888 \text{ g}$$

$$n_{\Delta} = \frac{(10 \times 10^{-3} - 1/2 \times 10 \times 10^{-3}) \times 888}{4,44} = 1$$

$M_{triglycéride} = 2x + y + M_{glycérol} - 3M_{H20} = 888$ g mol^{-1}

$2x + y = 850$ d'où 282 g.mol^{-1} $\leq x \approx y \leq$ 284 g.mol^{-1}

x = masse molaire de l'acide stéarique = 284 g.mol^{-1}

y = masse molaire de l'acide oléique = 282 g.mol^{-1}

Il s'agit du glycéride de stéaro-oléo-stéarique ou oléodistéarine (α stéarate, ß stéarate) (optiquement inactif).

Exercice n° 4 :

$$\mathbf{I_A} = \frac{5,5 \times 10^{-3} \times 0,5 \times 56\,100}{5} = 31$$

$$\mathbf{I_S} = \frac{11,3 \times 10^{-3} \times 0,5 \times 56\,100}{1} = 317$$

$\mathbf{I_E} = 317 - 31 = 286$

% d'acides gras = ($\mathbf{I_A}$ / $\mathbf{I_S}$) x 100 = 9,8 % : matière grasse impropre à la consommation.

Exercice n° 5 :

$$M_{triglycéride} = \frac{3 \times 56\,100}{196} = 859 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$n_{\Delta} = \frac{I_I \times 859}{254 \times 100} = \frac{59 \times 859}{254 \times 100} = 2$$

Il s'agit du glycéride palmito-dioléique ou de la palmito-dioléine.



DOSAGE DE L'AZOTE PAR LA MÉTHODE DE KJELDAHL

SOMMAIRE

PAGE

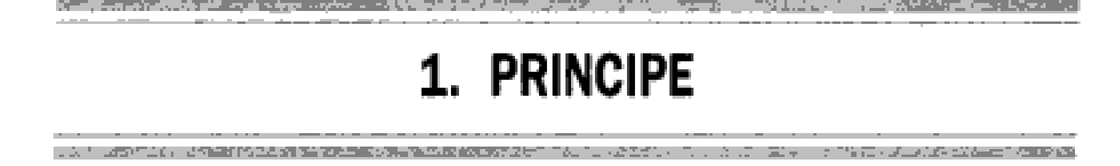
Le but de la manipulation est de déterminer la teneur en azote organique et minéral d'un produit biologique ou d'un produit agro-alimentaire.

L'azote dosé dans une urine **est essentiellement organique. Dans les conditions physiologiques, 80 à 85 % de l'azote total urinaire provient de l'urée et la quantité d'urée éliminée varie en fonction de la quantité de protéines apportées par l'alimentation.**

L'azote du lait **est essentiellement organique et protéique ; la détermination de l'azote Kjeldahl est utilisée pour estimer la teneur en protéines totales du lait.**

L'azote présent dans une eau **est organique (protéines, peptides, acides aminés ou urée) et minéral (ammoniac, nitrates ou nitrites). Une variation de sa teneur dans une eau lors d'un contrôle de qualité peut être un indicateur de pollution.**

La matière organique est préalablement détruite par minéralisation.



1. PRINCIPE

1.1. La minéralisation

L'échantillon à analyser est minéralisé par voie humide, en présence :
- d'acide sulfurique concentré, porté à ébullition ;
- de catalyseurs minéraux.

Dans ces conditions opératoires, l'acide sulfurique oxydant minéralise les éléments chimiques de la matière organique : C, H, N, O, P, S en CO_2, H_2O, phosphates, oxydes de soufre, tandis que l'azote organique est réduit en ammoniac, fixé sous forme de sulfate d'ammonium.

1.1.1. Les catalyseurs minéraux

Les catalyseurs accélèrent la minéralisation : la minéralisation est généralement lente. Elle peut durer de 30 à 180 min selon les échantillons analysés qui résistent plus ou moins à l'action de l'acide sulfurique concentré et bouillant. La présence de catalyseurs permet d'atteindre plus rapidement la fin de la minéralisation.

Les catalyseurs augmentent le rendement de la minéralisation : la minéralisation de l'azote est totale pour les fonctions azotées simples : fonctions amines, amides... Mais elle est partielle ou impossible avec les composés nitrés, nitrosés, avec les oximes, l'hydrazine et ses dérivés, et avec les hétérocycles azotés (azote des bases azotées des acides nucléiques, azote des coenzymes : NAD^+...). Le choix du catalyseur est alors important.

Les mélanges catalyseurs les plus souvent utilisés sont constitués de sulfate de potassium, de sulfate de cuivre, d'oxyde de mercure.

Parmi ces catalyseurs :

– certains servent à élever la température d'ébullition au cours de la minéralisation : le sulfate de sodium ou mieux, le sulfate de potassium. Ils sont introduits en quantité suffisante pour élever la température d'ébullition de 217 °C à environ 360-380 °C en fin de minéralisation ;

– d'autres facilitent la minéralisation en augmentant le pouvoir oxydant de H_2SO_4 concentré et bouillant : sels de cuivre, de sélénium ; oxydes de potassium ; permanganate de potassium...

Les deux catégories de catalyseurs sont souvent mélangées à l'avance : « catalyseur composé ». Des tablettes de catalyseur, de formule variable sont par ailleurs commercialisées.

REMARQUE : il faut éviter l'usage du mercure à cause de sa toxicité et des risques de pollution par les effluents. D'autre part, si le catalyseur renferme du mercure, celui-ci doit être précipité à l'aide d'hypophosphite de sodium ou de potassium introduit à l'état sec (1 g d'hypophosphite de sodium ou de potassium pour 1 g de mercure) avant l'alcalinisation qui précède la distillation de l'ammoniac.

Des métaux comme le sélénium, le titane, le tungstène... peuvent remplacer dans bien des cas le mercure.

La minéralisation doit être complète. Le fait que le liquide, après s'être éclairci, ne change plus de teinte, n'indique pas nécessairement que la minéralisation soit achevée : l'azote de certains acides aminés comme la lysine, le tryptophane, ou la tyrosine n'est minéralisé que par un chauffage prolongé de 30 à 90 min après la décoloration.

En général, un chauffage complémentaire de 30 à 40 min après la décoloration du minéralisat est suffisant.

1.1.2. Matériel utilisé

– Un matras de Kjeldahl dont le col allongé sert de condenseur des vapeurs.

– Une rampe de minéralisation avec chauffage électrique dont la température est contrôlée par thermostat... Le dispositif de chauffage doit permettre de chauffer le matras en position inclinée (30 à 45° par rapport à la verticale) de telle manière que seule la partie du ballon située au-dessous du niveau du liquide soit soumise au chauffage.

1.1.3. *Consignes de sécurité*

– Le port des lunettes de sécurité est conseillé au cours des étapes délicates du dosage de l'azote total (minéralisation et distillation).

– L'acide sulfurique concentré doit être manipulé avec précaution : verser soigneusement le produit du commerce concentré dans un bécher propre, sec et étiqueté, puis à l'aide d'une éprouvette graduée introduire l'acide sulfurique dans le matras.

– La minéralisation doit être conduite avec précaution car elle met en œuvre de l'acide sulfurique concentré et chaud. Il faut veiller à ce que le contenu du matras ne s'élève pas dans le col en moussant lors de l'ébullition.

– Introduire une bille de verre dans le matras afin de régulariser l'ébullition.

– Au cours de la minéralisation, l'acide sulfurique se décompose partiellement et il se dégage du dioxyde et du trioxyde de soufre (SO_2 et SO_3) sous forme de vapeurs blanchâtres très irritantes qu'il faut éviter de respirer. Pour éliminer ces vapeurs toxiques, il convient d'utiliser un dispositif d'absorption des vapeurs ou une hotte d'aspiration.

– Au cours de la minéralisation, il faut régulièrement agiter le matras par rotation, de façon à faire glisser vers le fond du matras les particules de substances qui adhèrent aux parois. L'utilisation d'un doigtier est conseillé pour éviter les brûlures au contact du verre.

– En fin de minéralisation, laisser refroidir les matras soit sur les rampes de minéralisation en arrêt de fonctionnement, soit au contact de l'air (fixer les matras au niveau du col à des supports stables par l'intermédiaire de pinces métalliques).

1.2. Alcalinisation et entraînement de l'ammoniac

Après dilution du liquide de minéralisation avec de l'eau distillée, il faut ajouter un excès d'hydroxyde de sodium (introduire à l'éprouvette un volume de lessive de soude tel que le nombre de moles d'ions OH^- apportés soit environ 1,2 à 1,5 fois plus grand que le nombre de moles d'ions H_3O^+ utilisés pour la minéralisation :
– l'acide sulfurique est neutralisé ;
– l'ammoniac formé est entraîné par distillation

$$NH_4^+ + OH^- \longrightarrow NH_3 + H_2O$$

1.2.1. *Appareillages*

Divers appareillages sont actuellement proposés en fonction du type de dosage à réaliser, par exemple :

– appareils à distiller de Schloesing pour les dosages en macrométhode et à réaliser en petit nombre : le minéralisat est transféré quantitativement dans le ballon à distiller. Le montage de l'appareil à distiller de Schloesing est schématisé sur la figure 4.1. ;

– appareils totalement automatisés pour les dosages en série : l'alcalinisation et l'entraînement de l'ammoniac se font directement dans le matras ;

– appareils de Markham avec entraînement à la vapeur d'eau pour les dosages en semimicrométhode *(fig. 4.2.)*.

Appareil de Schloesing

Il comprend :
- un ballon à long col ;
- un piège à hydroxyde de sodium ;
- un réfrigérant à eau ;
- une allonge à boule.

L'étanchéité en (1) et (2) est assurée par de la feuille anglaise qui doit maintenir en contact les extrémités des verreries.

Pour faciliter la mise en place de caoutchouc sur le verre, il est conseillé de mouiller avec de l'eau distillée le verre et le caoutchouc qui doivent entrer en contact.

Brancher le réfrigérant et faire bouillir de l'eau distillée dans le ballon du montage afin de rincer l'appareil à la vapeur d'eau.

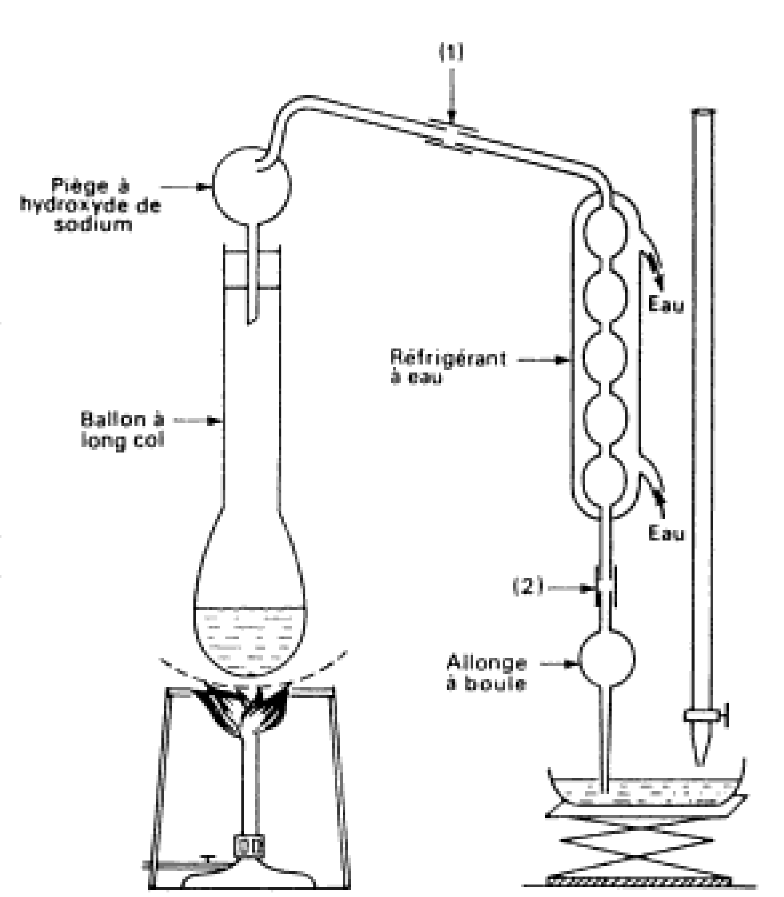


Fig. 4.1.

Appareil de Markham

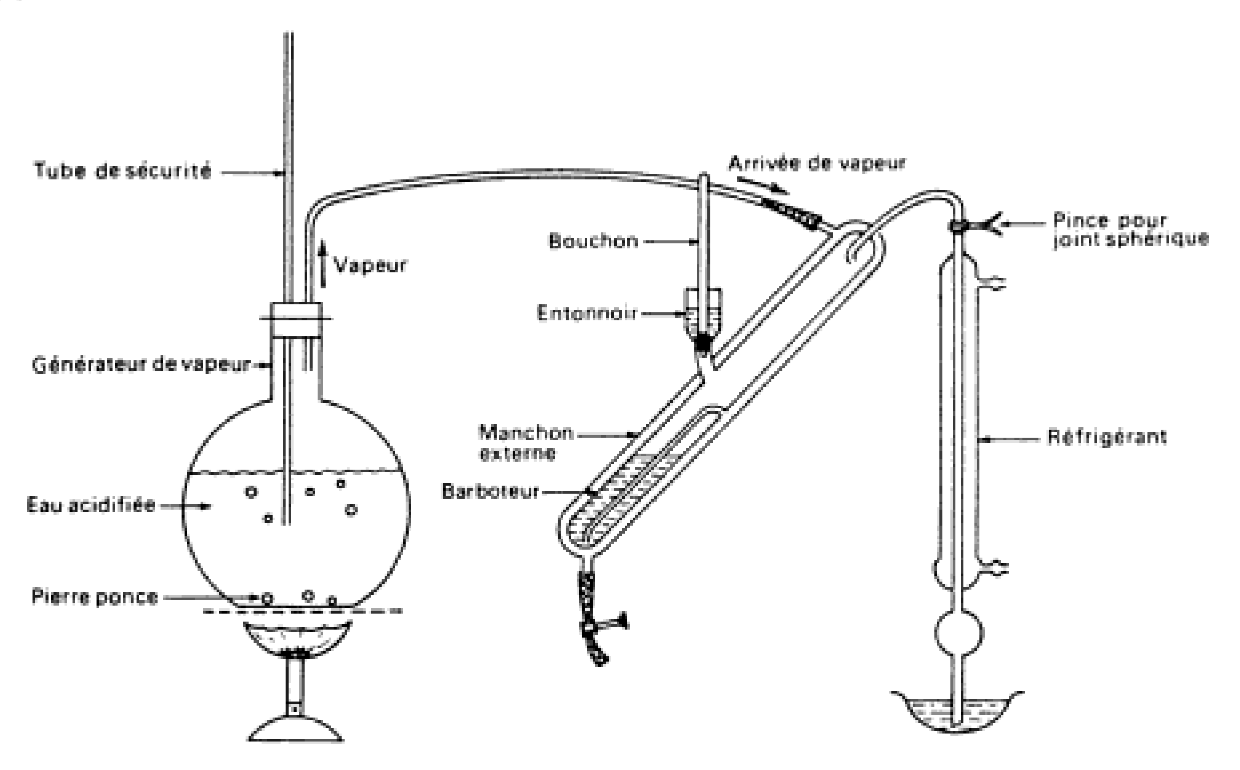


Fig. 4.2.

Il comprend :

– un générateur de vapeur d'eau ;

– un barboteur pour l'entraînement de l'ammoniac par la vapeur d'eau, associé à un entonnoir pour l'introduction des réactifs et à un piège à eau. Lorsque l'arrivée de la vapeur d'eau est interrompue (tuyau clampé entre le générateur et le barboteur), l'appareil se vidange automatiquement et est prêt pour l'essai suivant. Arrêter immédiatement le chauffage pour que la surpression engendrée dans le générateur de vapeur ne dépasse pas les capacités du tube de sécurité ;

– un réfrigérant à eau.

Introduire dans le ballon générateur de vapeur d'eau, de l'eau et quelques gouttes de H_2SO_4 dilué. Rincer l'appareil à la vapeur d'eau.

La circulation de l'eau dans les réfrigérants doit se faire du bas vers le haut afin que la condensation des vapeurs distillées soit efficace.

1.2.2. Conduite de la distillation

Diluer le contenu du matras tiède par addition progressive d'eau distillée : éviter que le contenu du matras prenne en masse lors du refroidissement, sinon tiédir légèrement pour permettre la redissolution.

Transvaser quantitativement le contenu du matras dans le ballon de l'appareil à distiller. Rincer soigneusement le matras et joindre les eaux de rinçage au minéralisat.

L'allonge du réfrigérant doit plonger dans la solution de recueil du distillat.

Alcaliniser le minéralisat par addition de lessive de soude à l'éprouvette. Il est possible de vérifier si l'alcalinisation est suffisante, en ajoutant préalablement deux à trois gouttes de phénolphtaléine qui doit rosir après l'addition de la lessive de soude.

Distiller en chauffant modérément et régulièrement afin d'éviter le passage des vapeurs de soude ou une aspiration de la solution de recueil dans l'allonge à boule. L'entraînement de l'ammoniac se produit très rapidement. A la fin de la distillation, abaisser la solution de recueil de façon à ce que l'embout de l'allonge à boule ne plonge plus dans la solution de dosage : les vapeurs qui se condensent rincent alors l'intérieur de l'allonge.

Arrêter le chauffage puis le réfrigérant quand le montage est refroidi.

1.2.3. Consignes de sécurité

– La lessive de soude doit être manipulée avec précaution : verser soigneusement le produit du commerce concentré dans un bécher propre, sec et étiqueté, puis à l'aide d'une éprouvette graduée introduire dans le ballon à distiller le volume nécessaire à l'alcalinisation du liquide de minéralisation.

Ne pas échanger les éprouvettes graduées utilisées pour mesurer les volumes d'acide sulfurique concentré et de lessive de soude.

– Le montage doit être stable, les différents éléments du montage étant fixés à un support par des pinces métalliques.

1.3. Dosage de l'ammoniac

Au cours de la distillation, l'ammoniac est entraîné par la vapeur d'eau qui est condensée et recueillie à la sortie du réfrigérant en vue soit d'un dosage direct, soit d'un dosage en retour de l'ammoniac du distillat.

1.3.1. Dosage direct

L'ammoniac est dosé par un acide fort (H_2SO_4) au fur et à mesure de l'entraînement par distillation *(fig. 4.3.)*.

Deux couples acide/base interviennent au cours du dosage :
- le couple : H_3O^+ / H_2O ;
- le coupe : NH_4^+ / NH_3 (pKa = 9,2).

L'acide le plus fort, H_3O^+ agit sur la base la plus forte NH_3 par une réaction pratiquement totale, alors que la dissociation de NH_4^+ est négligeable (acide trop faible).

$$\underset{\text{base}}{NH_3} + \underset{\text{acide}}{H_3O^+} \longrightarrow \underset{\text{acide}}{NH_4^+} + \underset{\text{base}}{H_2O}$$

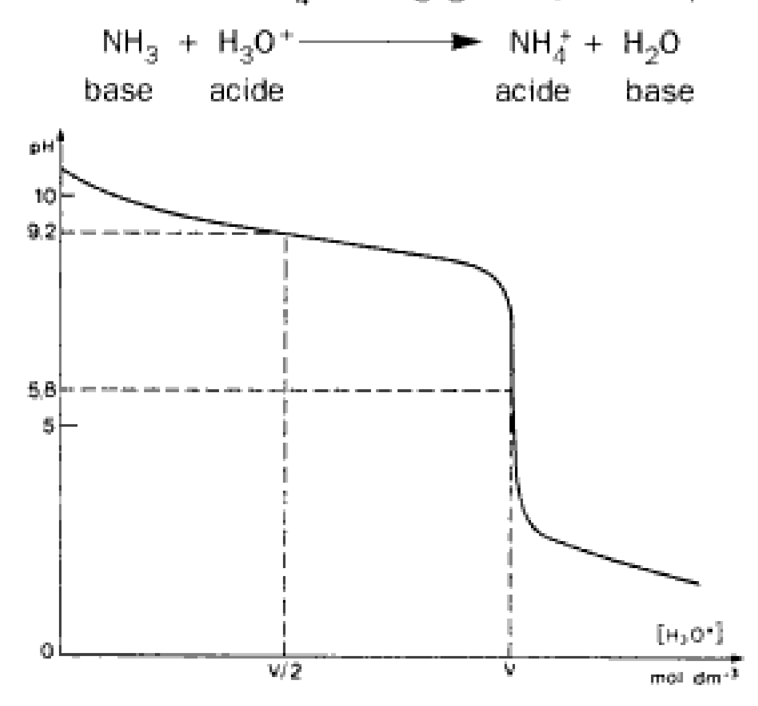


Fig. 4.3. Dosage d'une solution d'ammoniac à 0,01 mol.dm^{-3} par une solution d'acide sulfurique à 0,01 mol H_3O^+ dm^{-3}

La courbe de neutralisation montre que le pH de neutralisation de l'ammoniac est : $5 \leq$ pH équivalent ≤ 6.

A l'équivalence, la solution de dosage est acide. Il faut donc choisir un indicateur de pH convenable dont la zone de virage correspond à la zone d'équivalence :

	milieu acide	*pH limites de virage*			*milieu basique*
– vert de bromocrésol	jaune	3,8	vert	5,4	bleu
– rouge de méthyle	rouge	4,2	orangé	6,2	jaune

Indicateur de Tashiro ou indicateur RB : mélange de rouge de méthyle (indicateur de pH) et de bleu de méthylène (colorant de contraste) :

	milieu acide	*pH limites de virage*	*milieu basique*
– le rouge de méthyle	rouge	4,2 orangé 6,2	jaune
– bleu de méthylène :	bleu	bleu	bleu
– indicateur de Tashiro	violet	gris sale	vert

En fait, il est préférable de recueillir le distillat dans une solution d'acide borique (pKa = 9,2) qui « fixe » l'ammoniac, volatile, sous forme d'ions NH_4^+ stables, par la réaction suivante :

$$NH_3 + H\,B\,(OH)_4 \longrightarrow \underset{\text{ion borate}}{NH_4^+ + B(OH)_4^-}$$

L'ion borate est alors dosé par l'acide fort versé à la burette :

$$\underset{\text{ion borate}}{B(OH)_4^-} + H_3O^+ \longrightarrow H\,(BOH)_4 + H_2O$$

Avant le début de la distillation, la solution de recueil du distillat (acide borique + indicateur de Tashiro) sera amenée à la teinte gris sale de l'indicateur. Si besoin, utiliser pour acidifier une solution d'acide borique verdâtre quelques gouttes d'acide fort dilué (compte-gouttes), ou, pour alcaliniser une solution d'acide borique rouge violacée, quelques gouttes d'une base forte diluée (compte-gouttes).

Au cours de la distillation, l'acide fort (H_2SO_4) est versé à la burette de manière à rétablir la teinte gris sale qui disparaît après quelques minutes de distillation quand l'ammoniac se dégage (coloration verte de la solution de recueil).

L'acide fort doit être préalablement étalonné par pesée d'un produit pur pour analyses (hydrogénocarbonate de sodium ou de potassium, carbonate de sodium ou de potassium, tétraborate de sodium hydraté).

A la fin du dosage, on peut écrire que le nombre de moles d'azote, $n_{N\ \text{minéralisat}}$, présent dans l'échantillon analysé est :

$$n_{N\ \text{minéralisat}} = n_{NH_3\ \text{distillat}} = n_{H_3O^+\ \text{versées à la burette}}$$

Pour un volume E cm^3 d'échantillon analysé, de concentration molaire en azote C_N et pour un volume d'acide sulfurique V_D cm^3 versé à la burette au cours du dosage, l'équivalence ci-dessus peut être exprimée par :

$$C_N \times E = 2 \times C_{H_2SO_4} \times V_D$$

La concentration massique de l'échantillon analysé en grammes d'azote total par dm^3 est :

$$\rho_N = \frac{2 \times C_{H2SO4} \times V_D}{E} \times M_N = \frac{2 \times C_{H2SO4} \times V_D}{E} \times 14$$

1.3.2. *Dosage indirect ou en retour*

Le distillat est recueilli dans un excès précis d'une solution d'acide fort (acide sulfurique). Une partie de l'acide fort est neutralisée par l'ammoniac. A la fin de la distillation, l'excès d'acide fort est neutralisé en présence de l'indicateur de Tashiro, par une base forte : une solution d'hydroxyde de sodium, versée à la burette (virage du rouge violacé au gris sale).

Ce type de dosage évite les pertes d'ammoniac distillé mais la fin de la distillation est difficile à estimer : on considère soit le volume de distillat recueilli, soit la durée de l'opération. Ces critères ne peuvent être retenus que si des essais préalables ont montré que la distillation est totale dans les conditions opératoires choisies. Une distillation incomplète de l'ammoniac ou un entraînement accidentel de l'hydroxyde de sodium qui a servi à déplacer l'ammoniac peuvent passer inaperçus. Il est possible de s'assurer de la fin d'une distillation en plaçant du papier pH à l'extrémité du réfrigérant.

Les concentrations molaires de l'acide fort et de la base forte doivent être connues. Une des deux solutions (la solution d'hydroxyde de sodium par exemple) peut être étalonnée par pesée d'un produit pur pour analyses (acide oxalique, hydrogénophtalate de potassium) puis servir à déterminer la concentration molaire de l'acide fort.

A la fin du dosage, on peut écrire que le nombre de moles d'azote, $n_{N\ \text{minéralisat}}$, présent dans l'échantillon analysé est :

$$n_{N\ \text{minéralisat}} = n_{NH_3\ \text{distillat}} = n_{H_3O^+\ \text{initiales}} - n_{OH^-\ \text{versées à la burette}}$$

$$n_{N\ \text{minéralisat}} = (2 \times C_{H2SO4} \times E_D - C_{OH^-} \times V_D)\ 10^{-3}$$

(Volumes en cm^3)

Si C_{H2SO4} est déterminé par dosage volumétrique à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium (témoin) :

$$C_{H2SO4} = \frac{C_{OH^-} \times V_T}{2 \times E_T}$$

Pour un volume E cm^3 d'échantillon analysé, de concentration molaire en azote C_N

$$n_{N\ \text{minéralisant}} = \left(2 \times \frac{C_{OH^-} \times V_T}{2 \times E_T} \times E_D - C_{OH^-} \times V_D\right) \cdot 10^{-3} = C_{OH^-}\left(V_T \frac{E_D}{E_T} - V_D\right) \cdot 10^{-3} = C_N \times E \cdot 10^{-3}$$

La concentration massique de l'échantillon analysé en grammes d'azote total par dm^3 est :

$$\rho_N = \frac{C_{OH^-}}{E}\left(V_T \frac{E_D}{E_T} - V_D\right) \times M_N = \frac{C_{OH^-}}{E}\left(V_T \frac{E_D}{E_T} - V_D\right) \times 14$$

La méthode de Kjeldahl est très souvent retrouvée comme méthode officielle ou conventionnelle pour la détermination de la teneur en protéines d'un produit. Il est à noter que cette méthode de dosage de l'azote ne permet pas de distinguer l'azote non protéique de l'azote protéique et ne rend pas compte de la valeur réelle en protéines de l'échantillon analysé.

En tenant compte de la composition en acides aminés, la teneur moyenne en azote des protéines purifiées d'origine animale ou végétale est par convention estimée à 16 %, celle des cellules bactériennes à 14 %. Il faut donc multiplier la teneur en azote par un coefficient égal à 6,25 (100/16) pour évaluer la teneur en protéines si l'échantillon est d'origine animale ou végétale, égal à 7,14 (100/14) s'il s'agit de protéines bactériennes. Ces approximations entraînent des erreurs souvent non négligeables en fonction de la teneur en azote non protéique de l'échantillon.

2. DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL URINAIRE

2.1. Réactifs

- *Urine à doser.*
- *Acide borique à 40 g.dm $^{-3}$.*
- *Acide sulfurique pur (d = 1,83).*
- *Sulfate de potassium.*
- *Catalyseur d'oxydo-réduction.*
- *Lessive de soude* (d = 1,33).
- *Solution d'acide sulfurique* de concentration molaire voisine de 0,01 mol.dm $^{-3}$.
- *Indicateur R B ou de Tashiro :*

– rouge de méthyle : solution à 0,5 g.dm $^{-3}$ dans l'éthanol à 95° GL ;
– Bleu de méthylène : solution aqueuse à 1 g.dm $^{-3}$.
Ajuster l'apport de bleu de méthylène de manière à obtenir une teinte gris sale à pH 5,5.

- *Solution d'hydroxyde de sodium* de concentration molaire voisine de 0,02 mol.dm $^{-3}$.

- *Produits purs pour analyses* pour l'étalonnage par pesée d'un acide fort et/ou d'une base forte.

2.2. Fiche technique

2.2.1. Minéralisation

Dans un matras de minéralisation de 30 cm^3, introduire :
- urine diluée au 1/20 : 5 cm^3 ;
- H_2SO_4 concentré (éprouvette) : 1 cm^3 ;
- sulfate de potassium (K_2SO_4) : 0,5 g ;
- catalyseur de minéralisation : une pointe de spatule.

Ajouter une bille de verre.

Minéraliser : porter à ébullition rapidement et fortement au début de façon à chasser l'eau, puis maintenir une ébullition assez vive. Le mélange brunit puis devient limpide, d'une teinte bleu verdâtre très pâle. Continuer à chauffer encore pendant environ 30 minutes. Ne jamais surchauffer, ni chauffer à sec.

Laisser refroidir le minéralisat à l'air. Obturer le matras pour éviter toute contamination avec des vapeurs d'ammoniac.

2.2.2. Entraînement de l'ammoniac

Reprendre le liquide de minéralisation par 10 à 20 cm^3 d'eau distillée.

Chauffer légèrement pour redissoudre le contenu du matras, si celui-ci est pris en masse.

Transvaser le minéralisat dilué et les eaux de rinçage dans le ballon à distiller contenant environ 1/3 de son volume en eau distillée et 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine.

Ajouter des fragments de pierre ponce.

Quand le montage est prêt (l'embout de l'allonge doit tremper dans la solution de recueil et l'eau circuler dans le réfrigérant), alcaliniser le contenu du ballon à distiller par 3 à 5 cm^3 de lessive de soude.

Refermer immédiatement l'appareil et distiller pendant 10 à 20 min.

2.2.3. Dosage de l'ammoniac

Méthode directe

Dans une capsule de porcelaine, préparer la solution de recueil de l'ammoniac : 15 cm^3 d'acide borique additionné de quelques gouttes d'indicateur de Tashiro (ou R B) et amené préalablement à la teinte sensible gris sale de l'indicateur.

Doser l'ammoniac au fur et à mesure qu'il distille, à l'aide d'une solution d'acide sulfurique de concentration molaire C_{H2SO4} proche de 0,01 $mol.dm^{-3}$ étalonnée au préalable par pesée d'un produit pur pour analyses (semi-microburette : $V_D < 10\ cm^3$). Le dosage est considéré comme terminé lorsque la teinte gris sale subsiste pendant 2 à 3 minutes.

Méthode indirecte

Recueillir le distillat dans un excès E_D = 20 cm^3 d'acide sulfurique de concentration molaire C_{H2SO4} proche de 0,01 $mol.dm^{-3}$, en présence de quelques gouttes d'indicateur de Tashiro.

A la fin de la distillation, doser l'excès d'acide sulfurique contenu dans la capsule par une solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire voisine de 0,02 $mol.dm^{-3}$ (burette de 25 cm^3 : V_D > 10 cm^3).

La solution d'hydroxyde de sodium est à étalonner par pesée d'un produit pur pour analyses.

Réalisation d'un témoin-dosage : doser en présence d'indicateur de Tashiro E_T cm^3 d'acide sulfurique par la solution d'hydroxyde de sodium.

2.2.4. Questions

Déterminer la masse d'azote éliminé en 24 heures par les urines : dU-Azote (qm) en g.

Données : N = 14 $g.mol^{-1}$; diurèse du patient dU = 1,5 dm^3 en 24 heures ; dU-Azote (qm) : 8 à 16,5 g.

2.3. Technique : calculs

Urine minéralisée diluée par un coefficient 1/d = 1/20.

Dosage direct :

$$\text{dU-Azote (qm en g)} = \frac{2 \times C_{H2SO4} \times V_D}{E} \times 14 \times d \times dU = 168 \times C_{H2SO4} \times V_D$$

Dosage indirect :

$$\text{dU-Azote (qm en g)} = \frac{C_{OH-}}{E}\left(V_T \frac{E_D}{E_T} - V_D\right) \times 14 \times d \times dU = 84 \times C_{OH-} \left(V_T \frac{E_D}{E_T} - V_D\right)$$

3. DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL DU LAIT

L'azote organique du lait est à 95 % protidique. Par convention, une constante de 6,25 est utilisée pour convertir la valeur de l'azote Kjeldahl du produit en teneur de protéines.

Un coefficient de 6,38 qui tient compte de la composition en acides aminés des protéines du lait est parfois utilisé.

3.1. Réactifs

- *Lait à analyser.*
- *Solution d'acide sulfurique* de concentration molaire voisine de 0,05 mol.dm $^{-3}$.

Pour les autres réactifs, se reporter au § 2.1.

3.2. Fiche technique

3.2.1. Minéralisation

Dans un matras de minéralisation de 100 cm^3, introduire :
– lait préalablement agité : 5 cm^3 (ou m = 5 g de lait en poudre). (Utiliser une pipette à écoulement total et ajouter un minimum d'eaux de rinçage de la pipette) ;
– sulfate de potassium : 4 g ;
– catalyseur de minéralisation : 2 g ;
– H_2SO_4 concentré (éprouvette) : 15 à 20 cm^3.

Verser lentement et en agitant par rotation douce.
Ajouter une bille de verre.

Placer le matras en position inclinée sur la rampe à minéralisation.

Chauffer d'abord doucement puis augmenter progressivement le chauffage jusqu'à l'ébullition douce. Agiter de temps en temps.

Le lait charbonne et de la vapeur d'eau se dégage.

Poursuivre le chauffage pendant au moins 30 minutes après l'obtention d'une solution limpide.

Laisser refroidir le matras, obturé pour éviter toute contamination par des vapeurs d'ammoniac.

3.2.2. Entraînement de l'ammoniac

– Dans le matras, introduire progressivement 30 à 50 cm^3 d'eau distillée (tiédir légèrement si le contenu du matras prend en masse).

– Transvaser quantitativement le contenu du matras dans le ballon à distiller.
Ajouter les eaux de rinçage du matras.

– Ajouter de l'eau distillée pour que le ballon soit rempli jusqu'au 1/3 de sa capacité.

– Ajouter des fragments de pierre ponce.

Quand le montage est prêt (l'embout de l'allonge doit tremper dans la solution de recueil et l'eau circuler dans le réfrigérant), alcaliniser le contenu du ballon à distiller en introduisant à l'aide d'un entonnoir 55 à 65 cm^3 de lessive de soude. Refermer immédiatement l'appareil et distiller en chauffant modérement et régulièrement.

3.2.3. Dosage de l'ammoniac par méthode directe

Dans une capsule de porcelaine, préparer la solution de recueil de l'ammoniac : 20 cm^3 d'acide borique additionné de quelques gouttes d'indicateur de Tashiro (ou RB) et amené préalablement à la teinte sensible gris sale de l'indicateur.

Doser l'ammoniac au fur et à mesure qu'il distille, à l'aide d'une solution d'acide sulfurique de concentration molaire C_{H2SO4} proche de 0,05 $mol.dm^{-3}$ étalonnée au préalable par pesée d'un produit pur pour analyses.

Le dosage est considéré comme terminé lorsque la teinte gris sale subsiste pendant environ 5 minutes de distillation.

3.2.4. Questions

1) Déterminer l'azote total ou azote Kjeldahl du lait en $g.dm^{-3}$.
2) Calculer la concentration des protéines du lait, exprimée en $g.dm^{-3}$.

3.3. Technique : calculs

L'azote Kjeldahl du lait en $g.dm^{-3}$:

$$\rho_N = \frac{2 \times C_{H2SO4} \times V_D}{E} \times 14 = 5{,}6 \times C_{H2SO4} \times V_D$$

En considérant que les protéines du lait contiennent 16 % d'azote en masse, la concentration des protéines du lait, exprimée en $g.dm^{-3}$ est :

$$5{,}6 \times C_{H2SO4} \times V_D \times \frac{100}{16} = 35 \times C_{H2SO4} \times V_D$$

4. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ D'UNE EAU : DOSAGES DE L'AZOTE KJELDAHL

Semi-microméthode de Markham :

L'azote total d'une eau correspond essentiellement à 4 catégories de composés azotés :

$$N\ total = \underbrace{N_{organique} + N_{NH4+}}_{\text{azote Kjeldahl}} + N_{NO2-} + N_{NO3-}$$

Le dosage de l'azote Kjeldahl d'une eau ne permet pas de déterminer l'azote total : l'azote oxydé (NO_2^-, NO_3^-) et l'azote des composés nitrés ou nitrosés ne sont pas dosés. Il correspond au dosage de l'azote organique réduit et de l'azote ammoniacal :

$N_{organique} + N_{NH4+}$.

Après minéralisation de l'azote organique, la quantité d'ions ammonium formés étant réduite, l'ammoniac déplacé en milieu alcalin est entraîné par un courant de vapeur d'eau selon la semi-microméthode de Markham.

Le montage de l'appareil à distiller par entraînement à la vapeur d'eau de Markham est schématisé sur la figure 4.2.

4.1. Réactifs

- *Eau à analyser.*
- *Solution d'acide borique à 5 g.dm^{-3}.*
- *Agent anti-moussant.*

Pour les autres réactifs, se reporter au § 2.1.

4.2. Fiche technique

4.2.1. Minéralisation

Dans un matras de minéralisation, introduire :
– Eau à analyser (eau de rivière ou d'un puits) : 50 à 100 cm^3 (l'échantillon doit contenir de 0,2 à 20 mg d'ammonium) ;
– H_2SO_4 concentré (éprouvette) : 10 cm^3 ;
– Catalyseur de minéralisation : 1 g.

Ajouter une bille de verre.

Chauffer fortement.
Poursuivre la minéralisation jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.
Laisser refroidir le minéralisat à l'air.

4.2.2. Entraînement de l'ammoniac

– Introduire dans le générateur de vapeur, de l'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'acide sulfurique dilué pour fixer d'éventuelles traces d'ammoniac.

– Porter à ébullition l'eau distillée du générateur de vapeur. Rincer l'appareil à la vapeur d'eau. Vidanger l'appareil.

– Débrancher le générateur de vapeur d'eau et continuer à faire chauffer l'eau.

– Dans la capsule en porcelaine, préparer la solution de recueil : acide borique à 5 $g.dm^{-3}$ (environ 25 cm^3) ; indicateur de Tashiro (quelques gouttes).

Amener la solution de recueil à la teinte gris sale de l'indicateur et y plonger l'allonge du réfrigérant.

– Diluer le produit de minéralisation par addition d'eau distillée, l'introduire dans le ballon ou barboteur de l'appareil. Joindre les eaux de lavage du matras.

– Introduire lentement dans l'entonnoir 50 cm^3 de lessive de soude (éprouvette) additionnée de phénolphtaléine pour vérifier l'alcalinité du minéralisat. Obstruer aussitôt l'entonnoir.

– Commencer l'entraînement de l'ammoniac : brancher le générateur de vapeur.

4.2.3. Dosage volumétrique de l'ammoniac

Doser l'ammoniac au fur et à mesure de son entraînement à l'aide d'une solution d'acide sulfurique de concentration molaire égale ou inférieure à 0,01 $mol.dm^{-3}$. Utiliser une microburette ($V < 5$ cm^3) ou semi-microburette ($V < 10$ cm^3).

4.2.4. Questions

Déterminer la teneur en azote Kjeldahl exprimée en milligrammes par dm^3 d'eau à analyser.

4.3. Technique : calculs

$$\text{Azote Kjeldahl } (mg.dm^{-3}) = \frac{2 \times C_{H2SO4} \times V_D}{E} \times 14.10^3 = 28\,000 \times C_{H2SO4} \times \frac{V_D}{E}$$

5. EXERCICES

Exercice n° 1 : détermination de la teneur en azote d'un mélange S : urée-protéines (extrait sujet d'examen)

1) On minéralise 1 cm^3 de solution S. L'ammoniac formé est recueilli dans 20 cm^3 d'acide sulfurique à 0,051 $mol.dm^{-3}$. Le volume de solution d'hydroxyde de sodium à verser pour doser l'excès d'acide est de 12,75 cm^3.
D'autre part, 10 cm^3 du même acide sont neutralisés par 10,5 cm^3 de solution alcaline.

Quelle est la teneur en azote de ce mélange, exprimée en $g.dm^{-3}$?

2) On traite par ailleurs 20 cm^3 de solution S par 20 cm^3 d'acide trichloracétique à 20 %. Le mélange est filtré. On dose 5 cm^3 de filtrat par la même méthode que précédemment mais en recueillant l'ammoniac dans de l'acide borique. Il faut 9 cm^3 de l'acide sulfurique précédant dilué au 1/2 pour doser l'ammoniac.

Calculer la teneur du mélange en urée et protéines. On considère que les protéines contiennent en moyenne 16 % d'azote.

Exercice n° 2 : dosage de l'azote total d'un tétrapeptide par la méthode de Kjeldahl, semi-microméthode de Markham (extrait d'un sujet du concours général)

1 cm^3 d'une solution à 20 $g.dm^{-3}$ du tétrapeptide (masse molaire = 469 $g.mol^{-1}$) a été minéralisé en présence de 1 cm^3 d'acide sulfurique concentré et de catalyseur de minéralisation.

L'ammoniac a été recueilli dans 20 cm^3 d'acide sulfurique de concentration molaire égale à 0,01 $mol.dm^{-3}$. Le dosage de l'excès d'acide a nécessité 5,1 cm^3 d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,02 $mol.dm^{-3}$.

Déterminer la teneur en azote du peptide exprimée en g/100 g.

Calculer le nombre de moles d'azote présent dans la structure du peptide.

Exercice n° 3 : contrôle de la teneur en azote total et en protéines d'un aliment (extrait d'un sujet de CAPET)

Dans un matras, on minéralise 15,0000 g d'aliment en présence de catalyseur et d'acide sulfurique concentré. Le contenu du matras est ensuite transvasé intégralement dans une fiole jaugée de 100 cm^3, qu'on ajuste au trait de jauge avec de l'eau distillée (solution E).

On distille V = 10 cm^3 de solution E, en présence d'un excès de solution d'hydroxyde de sodium concentrée. Le distillat est recueilli dans 20 cm^3 de solution d'acide sulfurique environ 0,01 $mol.dm^{-3}$. On dose l'excès d'acide par une solution d'hydroxyde de sodium

telle que 1 cm^3 de cette solution correspond à 0,280 mg d'azote, en présence d'un indicateur de pH. On verse Ve = 8,20 cm^3 jusqu'au virage. Par ailleurs, on prépare un témoin de minéralisation, en remplaçant l'aliment par une masse d'eau égale. Après traitement identique à l'essai, on distille V = 10 cm^3 de la solution E' obtenue. On verse V_T = 20,30 cm^3 pour atteindre le virage de l'indicateur.

Calculer la teneur de l'aliment en azote total, en mg pour 100 g.

Calculer sa teneur en protéines, en considérant que celles-ci contiennent environ 16 % d'azote.

L'aliment a une teneur en nitrates de 16,7 mg pour 100 g, faut-il tenir compte de ce résultat pour le calcul de la teneur en protéines ?

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 : détermination de la teneur en azote d'un mélange S : urée-protéines

1) Témoin: $C_{OH^-} = 2\,\dfrac{C_{H2SO4} \times E_T}{V_T}$

Dosage de l'azote total :

$$N_{g.\,dm^{-3}} = 2\frac{C_{H_2SO_4}}{E_{minéralisat}}\left(E_D - E_T \times \frac{V_D}{V_T}\right) \times 14 = \frac{2 \times 0{,}051}{1}\left(20 - 10 \times \frac{12{,}75}{10{,}5}\right) \times 14 = 11{,}22$$

2) $N_{uréique}$ en $g.dm^{-3}$ (S) $= 2\dfrac{C'_{H_2SO_4} \times V_D}{E} \times 14 \times 2 = 2{,}57$ (dilution au 1/2 par le TCA)

Urée en $g.dm^{-3}$ (S) $= \dfrac{2{,}57}{14} \times \dfrac{1}{2} \times 60 = 5{,}51$

N protéique en $g.dm^{-3}$ = 11,22 – 2,57 = 8,65

Protéines en $g.dm^{-3}$ $= 8{,}65 \times \dfrac{100}{16} = 54{,}1$

Exercice n° 2 : dosage de l'azote total d'un tétrapeptide par la méthode de Kjeldahl

Le nombre de moles d'azote dans 1 cm^3 de solution peptide est :

$n_N = n_{H+} - n_{OH-} = 2\ n_{H2SO4} - n_{OH-} = 2 \times 0{,}01 \times 20.10^{-3} - 0{,}02 \times 5{,}1.10^{-3} = 0{,}298.10^{-3}$

La teneur en azote du peptide en % de masse est :

$$\frac{0{,}298 \times 14}{20} \times 100 = 20{,}86\ \%$$

Nombre de moles d'azote par mole de peptide :

$$0{,}298 \times \frac{469}{20} = 7$$

Exercice n° 3 : contrôle de la teneur en azote total et en protéines d'un aliment

Teneur de l'aliment en azote total en mg pour 100 g :

$$\frac{(20{,}30 - 8{,}20) \times 0{,}280}{10} \times 100 \times \frac{100}{15} = 226 \text{ mg pour } 100 \text{ g}$$

Teneur en protéines : $226.10^{-3} \times 6{,}25 = 1{,}41\ \%$

Non : car les ions NO_3^- ne représentent pas de l'azote protéique et ne sont pas dosés par la méthode de Kjeldahl.



DISTILLATION. APPLICATION AU DOSAGE CHIMIQUE DE L'ÉTHANOL

SOMMAIRE

PAGE

Le but de la manipulation est de séparer un composé volatil d'un mélange liquide complexe par distillation simple avant de le doser.

Cette technique peut être appliquée à des molécules diverses comme l'éthanol, l'acétone en vue de :

- **déterminer une alcoolémie ;**
- **déterminer le degré alcoolique d'une boisson ;**
- **faire un suivi de fermentation.**

Cette méthode de dosage peut donc être utilisée dans des manipulations plus complexes comme :

- **l'établissement d'un rendement de fermentation ;**
- **l'analyse d'une boisson (parallèlement au dosage des sucres, de la vitamine C...) ;**
- **l'étude comparative des différentes méthodes de dosage de l'éthanol : méthode enzymatique, chromatographie en phase gazeuse.**

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **distillation à pression normale ;**
- **distillat ;**
- **volatilité et température d'ébullition ;**
- **alcoolémie ;**
- **degré alcoolique ;**
- **méthode officielle.**

1. PRINCIPE

La manipulation se fait en deux temps :

- *Premier temps* : distillation simple, sous pression atmosphérique de l'éthanol. La distillation permet de séparer l'éthanol d'un mélange liquide en utilisant sa volatilité importante et d'éliminer ainsi des molécules (aldéhydes par exemple) qui pourraient interférer dans le dosage chimique non spécifique.

- *Deuxième temps* : dosage de l'éthanol du distillat par dosage en retour (oxydation chromique en milieu acide) à l'aide d'une solution *titrée* de thiosulfate de sodium.

L'éthanol est oxydé par une quantité connue et en excès de dichromate de potassium, en milieu acide (le mélange nitrochromique utilisé est un mélange de $K_2Cr_2O_7$ et HNO_3).

$$(CH_3 - CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3\,COOH + 4\,H^+ + 4\,e^-) \times 3$$

$$(Cr_2O_7^{2-} + 14\,H^+ + 6\,e^- \rightarrow 2\,Cr^{3+} + 7\,H_2O) \times 2$$

$$2\,Cr_2O_7^{2-} + 16\,H^+ + 3\,CH_3 - CH_2\,OH \rightarrow 3\,CH_3\,COOH + 4\,Cr^{3+} + 11\,H_2O$$

L'excès de dichromate est dosé par iodométrie. Après dilution du milieu, on ajoute un excès d'iodure, de manière à réduire le dichromate du milieu.

$$Cr_2O_7^{2-} + 14\,H^+ + 6\,e^- \rightarrow 2\,Cr^{3+} + 7\,H_2\,O$$

$$(2\,I^- \rightarrow I_2 + 2\,e^-) \times 3$$

$$Cr_2O_7^{2-} + 14\,H^+ + 6\,I^- \rightarrow 2\,Cr^{3+} + 3\,I_2 + 7\,H_2O$$

L'iode formé est dosé par le thiosulfate.

$$I_2 + 2\,e^- \rightarrow 2\,I^-$$

$$2\,S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2\,e^-$$

$$I_2 + 2\,S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2\,I^-$$

1 mole d'éthanol correspond à 4 moles de thiosulfate.

Il s'agit d'un dosage en retour ; on réalise donc, dans les mêmes conditions, un témoin en remplaçant la prise d'essai par le même volume d'eau fraîchement redistillée.

2. RÉACTIFS ET MATÉRIEL

2.1. Montage de distillation

- Ballon.
- Colonne de Vigreux.
- Réfrigérant.
- Pierre ponce ou billes de verre.

2.2. Pour le dosage

• *Solution saturée d'acide picrique* : dissoudre à chaud 15 g d'acide picrique dans 1 000 ml d'eau distillée, faire bouillir 15 mn, laisser refroidir, décanter la solution.

• *Solution nitrochromique :*
– $K_2Cr_2O_7$ pur p a : 2,45 g ;
– HNO_3 pur p a q s p : 1 000 ml.

• *Solution d'iodure de potassium à 100 g.dm^{-3}.*

• *Solution de thiosulfate de sodium* ~ 0,05 mol.dm^{-3} :
– $Na_2S_2O_3$, $5H_2O$: 12,5 g ;
– eau distillée q s p : 1 000 ml.

• *Mélange sulfochromique* (lavage de l'appareil de distillation) : mélanger volume à volume l'acide sulfurique concentré à une solution aqueuse à 10 % de dichromate de potassium.

• *Thiodène.*

• *Eau redistillée* : pour les dilutions et le témoin.
Verser dans le ballon à distiller (capacité 1 l), environ 300 cm^3 d'eau distillée.
Chauffer, distiller.
Rejeter la fraction de tête, soit environ 50 cm^3 d'eau redistillée, éventuellement souillée d'impuretés réductrices volatiles, puis recueillir 150 à 200 cm^3 d'eau redistillée.
Jeter le résidu de distillation.

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Précautions expérimentales

La conduite d'une distillation simple sous pression atmosphérique doit obéir à certaines règles :
– élever la température progressivement ;
– adapter la puissance de chauffage à la vitesse de distillation souhaitée ;
– ajouter de la pierre ponce ou des billes de verre qui, en favorisant la formation de bulles, évite les phénomènes de surchauffe et les soubresauts ;
– ne jamais distiller à sec ;

– recueillir le distillat dans une fiole jaugée renfermant de l'eau redistillée par l'intermédiaire d'une allonge trempant dans cette eau ; la fiole doit elle-même tremper dans un bain d'eau froide ;
– laisser refroidir le résidu de distillation avant d'ouvrir l'appareil.

3.2. Distillation de l'éthanol

L'appareil est monté comme indiqué sur la figure 5.1.

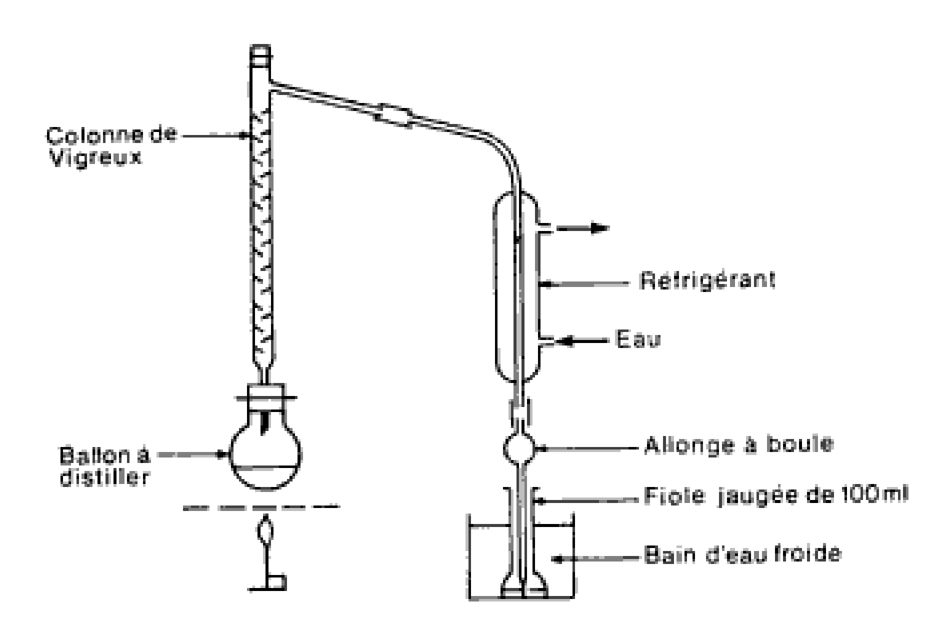


Fig. 5.1. Appareil à distiller

3.2.1. Traitement de la prise d'échantillon

- Pour la détermination de l'alcoolémie, verser dans le ballon à distiller :

– V = 50 cm^3 de solution saturée d'acide picrique ;
– 10 cm^3 de sang lentement et en agitant (utilisation de propipette et de gants).

- Pour un suivi de fermentation :

– prise d'essai renfermant environ 1 cm^3 d'éthanol pour v cm^3 ;
– (60 – v) cm^3 d'eau redistillée.

- Pour la détermination du degré alcoolique d'un vin :

– 10 cm^3 de vin ;
– 50 cm^3 d'eau redistillée ;
– goutte à goutte, solution d'hydroxyde de sodium à 1 $mol.dm^{-3}$ jusqu'à neutralisation.

3.2.2. Conduite de la distillation

– Chauffer doucement et recueillir l'éthanol dans une fiole jaugée de 100 cm^3 renfermant environ 40 cm^3 d'eau redistillée.

– Distiller environ 45 cm^3.
– Compléter au trait de jauge après avoir rincé l'allonge avec de l'eau redistillée.

3.3. Dosage de l'éthanol

Prendre toutes les précautions relatives aux dosages iodométriques (voir p. 42).

Introduire dans un erlenmeyer bouchant émeri de 250 cm^3 :
– 20 cm^3 de distillat ;
– 20 cm^3 de la solution nitrochromique (utiliser une poire d'aspiration).

Boucher, agiter et laisser reposer 30 minutes.

Ajouter 100 cm^3 d'eau distillée et 20 cm^3 d'une solution d'iodure de potassium à 100 $g.dm^{-3}$.

Attendre 2 minutes puis doser l'iode formé par une solution titrée de thiosulfate à ≈ 0,05 $mol.dm^{-3}$ en présence de thiodène additionné en fin de dosage.

Soit V_1 le volume versé en cm^3.

Le volume de dichromate ayant participé à l'oxydation de l'éthanol doit être inférieur à la moitié du volume du dichromate introduit ; éventuellement recommencer un essai avec une prise d'essai plus petite de distillat.

3.4. Réalisation d'un témoin

Opérer comme pour l'essai en remplaçant le distillat par de l'eau redistillée. Il est inutile d'attendre 30 minutes.

Soit V_2 le volume versé en cm^3.

4. RÉSULTATS

4.1. Expression littérale de la concentration en éthanol exprimée en $mol.dm^{-3}$ d'échantillon analysé.

$$C = C\text{thiosulfate} \frac{(V_2 - V_1)}{20} \frac{100}{4\,v}$$

4.2. Cas particulier de l'alcoolémie : exprimer l'alcoolémie en $g.dm^{-3}$. Interpréter le résultat.

$$\rho = C \times 46$$

4.3. Cas particulier du dosage de l'éthanol d'une boisson alcoolisée : exprimer le résultat en pourcentage volumique.

$$\% = \frac{\rho}{0{,}7936 \times 10}$$

Donnée : 1 cm^3 d'éthanol par pesée à 20 °C = 0,7936 g.

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

La méthode officielle du dosage de l'éthanol d'un vin préconise l'utilisation d'une solution de $K_2Cr_2O_7$ telle que 1 dm^3 de cette solution oxyde 1 dm^3 d'éthanol à 1 % à 20 °C. Calculer la concentration massique de cette solution.

Exercice n° 2 :

L'alcotest : il existe une relation entre la teneur en éthanol de l'air expiré et l'éthanolémie.

La mesure de la teneur en éthanol de l'air expiré est faite en soufflant dans un ballon un volume d'air expiré. Ce volume d'air passe sur un gel de silice. Que renferme ce gel de silice ? Quel est le principe de fonctionnement d'un alcootest ?

Exercice n° 3 :

Faire une étude comparative des méthodes de dosage chimique et enzymatique de l'éthanol.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

$C = 33{,}72\ g.dm^{-3}$.

Exercice n° 2 :

Alcootest : le gel de silice renferme un mélange sulfochromique qui est réduit par l'éthanol en Cr^{3+} ce qui entraîne l'apparition d'une couleur verte.

Exercice n° 3 :

La méthode enzymatique :
- est plus spécifique ;
- est plus sensible ;
- a une plus faible limite de détection ;
- a une plus grande praticabilité, ce qui permet une adaptation à des dosages en série.



POTENTIOMÉTRIE DES ACIDES AMINÉS. DOSAGES DE QUATRE ACIDES AMINÉS

SOMMAIRE

Le but de la manipulation est de doser quantitativement chacun des acides aminés en solution aqueuse.

La manipulation permet de tracer la courbe de titrage de chacune de ces molécules.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **ampholyte ;**
- **pK_1, pK_2 pK_R d'un acide aminé ;**
- **charge nette d'un acide aminé ;**
- **volume équivalent ;**
- **pH_i : définition, calculs ;**
- **pH d'une solution aqueuse d'un acide aminé.**

1. PRINCIPE

Les acides aminés sont porteurs d'une fonction acide et d'une fonction aminée. Leur formule générale s'écrit :

$$H_2N - \underset{\displaystyle R}{\underset{|}{\overset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{C}}}} - H$$

Si R ne possède aucune fonction ionisable, l'acide aminé est *neutre* : c'est le cas de la *glycine*.

L'arginine qui possède une fonction α carboxylique, une fonction α aminée et un groupement guanidino chargé positivement à pH 7 est un acide aminé *basique*.

L'acide aspartique qui possède une fonction α carboxylique, une fonction α aminée et, au niveau de la chaîne latérale une seconde fonction carboxylique chargée négativement à pH 7, est un acide aminé *acide*.

L'histidine qui possède une fonction α carboxylique, une fonction α aminée et une structure imidazole faiblement ionisée à pH 7 est un acide aminé basique.

1.1. La glycine

En solution aqueuse, la glycine se présente sous forme d'un ion bipolaire : $A^{\pm}$.

$$\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH_3^+ \end{array}$$

La titration de la fonction carboxylique par un acide fort s'écrit :

$$\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH_3^+ \end{array} + H^+ + Cl^- \longrightarrow \begin{array}{c} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH_3^+ \end{array} + Cl^- \quad (pH \approx 2)$$

La titration de la fonction aminée par une base forte s'écrit :

$$\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH_3^+ \end{array} + Na^+ + OH^- \longrightarrow \begin{array}{c} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH_2 \end{array} + Na^+ + H_2O \quad (pH \approx 11)$$

D'où les équilibres d'ionisation faisant intervenir la structure dipolaire de la glycine :

$$\underset{\substack{A^+ \\ (pH \approx 2)}}{\begin{array}{c} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH_3^+ \end{array}} \underset{pK_1}{\overset{H^+}{\underset{H^+}{\rightleftharpoons}}} \underset{A^{\pm}}{\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH_3^+ \end{array}} \underset{pK_2}{\overset{H^+}{\underset{H^+}{\rightleftharpoons}}} \underset{\substack{A^- \\ (pH \approx 11)}}{\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH_2 \end{array}}$$

$A^{\pm}$: la charge nette de l'acide aminé est nulle pour $pK_1 < pH_i < pK_2$
avec $pH_1 = 1/2\,(pK_1 + pK_2) = 1/2\,(2{,}34 + 9{,}60) = 5{,}97$.

Le pH de la solution aqueuse correspond au pH_i de la glycine, $pH \approx 6$.

A^+ et A^- : les pH équivalents obtenus par neutralisation ($pH \approx 2$ pour A^+ ou $pH \approx 11$ pour A^-) se situent dans une zone de pH où il n'est pas possible de les déterminer avec précision, avec les électrodes de verre traditionnelles.

La titration de la glycine est effectuée en présence de méthanal en excès : c'est la formol titration.

Le méthanal, en excès, se fixe sur la fonction – NH_3^+ de l'ion bipolaire.

$$COO^- - CH_2 - NH_3^+ \; + \; 2 \; H{-}C({=}O){-}H \longrightarrow COO^- - CH_2 - N^+H(CH_2OH)_2$$

glycine	réactif en excès	dérivé N–dihydroxyméthylé

La fonction N-dihydroxyméthylée est nettement plus acide ($pK_2 \approx 6$) que la fonction – NH_3^+ de la glycine ($pK_2 \approx 9{,}6$).

Le pH au point équivalent est fortement abaissé et se trouve alors dans le domaine d'utilisation de l'électrode de verre et l'on peut déterminer graphiquement le point équivalent V *(fig. 6.1.)*.

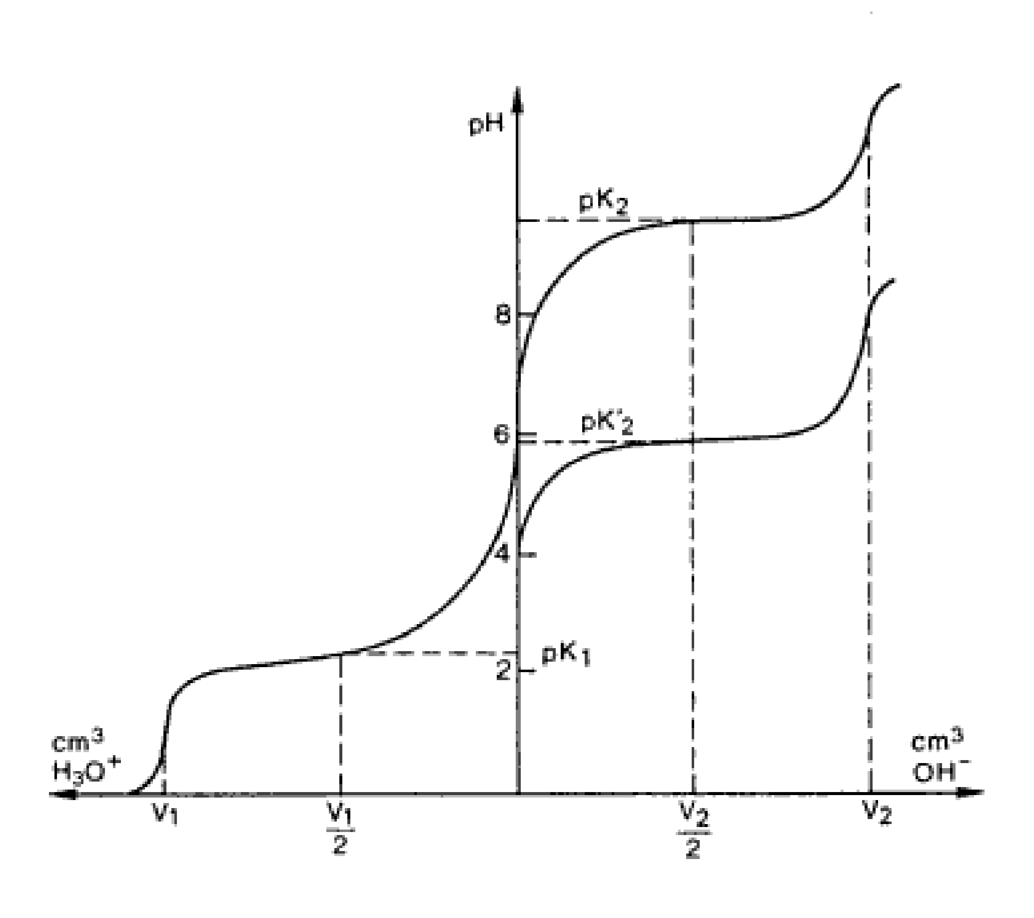
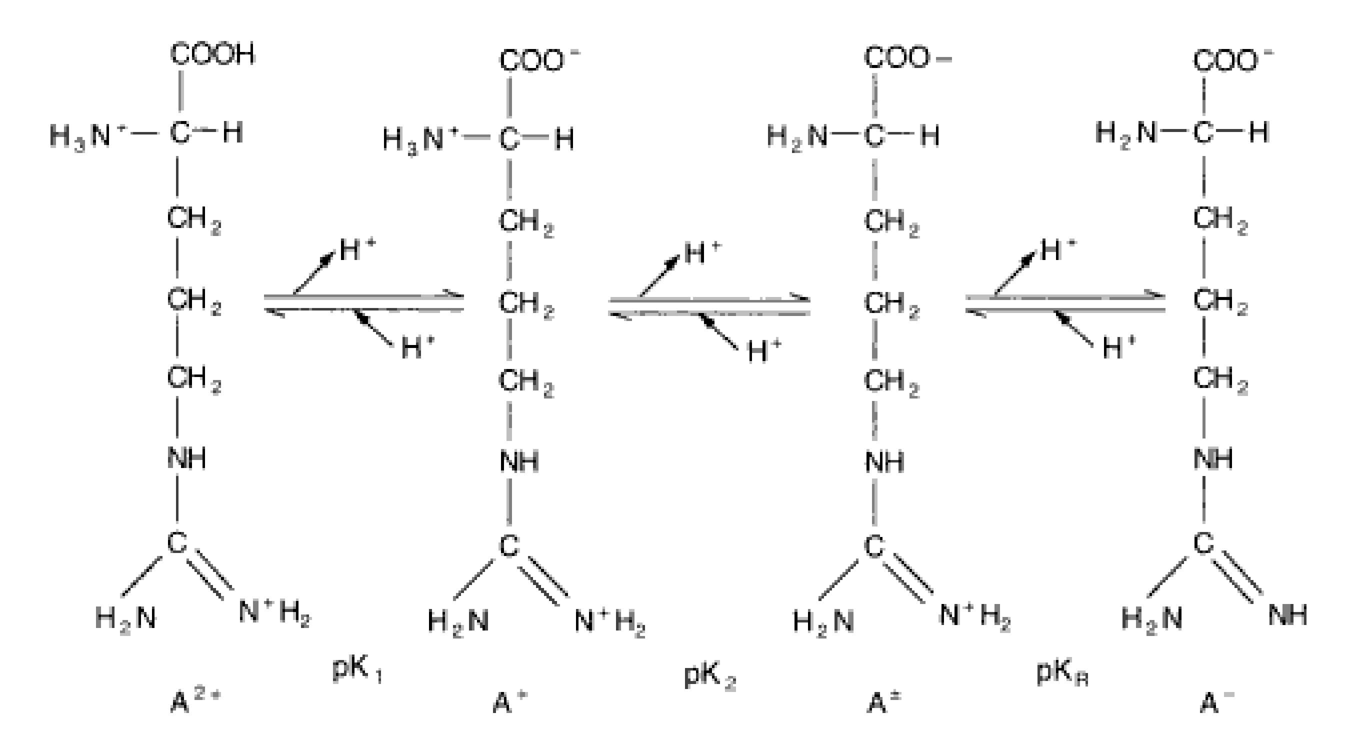


Fig. 6.1. Courbe de titrage de la glycine

1.2. L'arginine



Le pH de la solution aqueuse est donné par le pH_i de l'arginine : l'acide aminé est sous la forme $A^{\pm}$:

D'où : $pK_2 < pH_i < pK_R$;

avec : $pH_i = 1/2\ (pK_2 + pK_R)$;

soit : $pH_i = 1/2\ (9{,}04 + 12{,}48) = 10{,}76$.

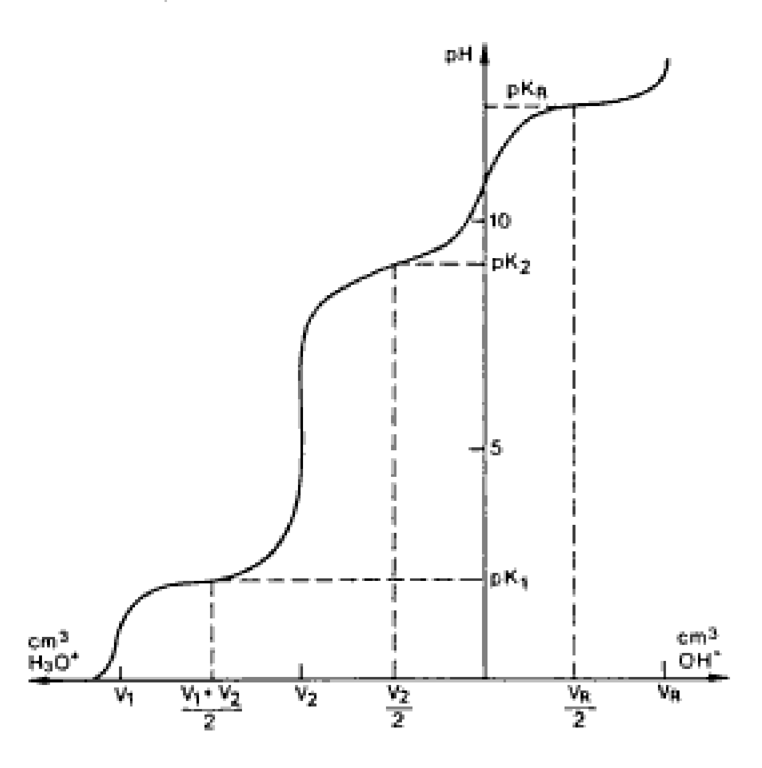


Fig. 6.2. Courbe de titrage de l'arginine

Il est possible de titrer l'arginine par un acide fort au niveau de son pK_2 soit :

$$H_2N-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=N^+H_2)-NH_2 + H^+ + Cl^- \xrightarrow{pK_2} H_3N^+-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=N^+H_2)-NH_2 + Cl^-$$

Le pH équivalent est alors voisin de 5,6 et peut être facilement déterminé. On dose ainsi une seule fonction de l'arginine : *la fonction α NH_2 (fig. 6.2.).*

1.3. L'acide aspartique

$$\underset{A^+}{H_3N^+-CH(COOH)-CH_2-COOH} \underset{H^+}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}}_{pK_1} \underset{A^\pm}{H_3N^+-CH(COO^-)-CH_2-COOH} \underset{H^+}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}}_{pK_R} \underset{A^-}{H_3N^+-CH(COO^-)-CH_2-COO^-} \underset{H^+}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}}_{pK_2} \underset{A^{2-}}{H_2N-CH(COO^-)-CH_2-COO^-}$$

Le pH de la solution est donné par le pH_i de l'acide aspartique.

L'acide aminé est sous la forme $A^\pm$ pour un pH_i tel que : $pK_1 < pH_i < pK_R$

d'où : $pH_i = 1/2\ (pH_1 + pK_R) = 1/2\ (2{,}09 + 3{,}86) = 2{,}98$.

L'acide aspartique en solution aqueuse peut être titré soit par une base forte (NaOH), soit par un acide fort (HCl).

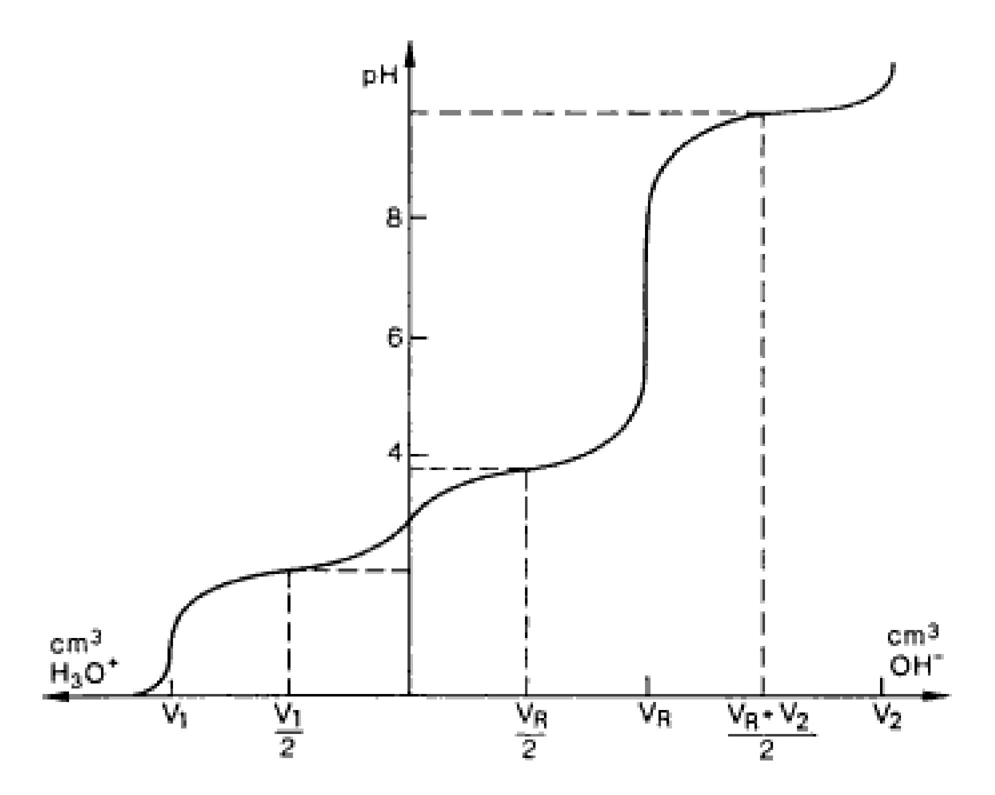


Fig. 6.3. Courbe de titrage de l'acide aspartique

Il est possible de titrer l'acide aspartique au niveau de son pK_R par la soude selon l'équation :

$$
\begin{array}{ccccc}
\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ H_3N^+-C-H \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{array} & + \; Na^+ \; + \; OH^- & \xrightarrow[pK_R]{} & \begin{array}{c} COO^- \\ | \\ H_3N^+-C-H \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COO^- \end{array} & + \; Na^+ \; + \; H_2O \\
A^{\pm} & & & A^- &
\end{array}
$$

Le pH équivalent est alors voisin de 6,8 et peut être facilement déterminé.

On dose ainsi une seule fonction de l'acide aspartique : *la fonction ß COOH (fig. 6.3.).*

1.4. L'histidine

$$A^{2+} \underset{pK_1}{\rightleftharpoons} A^{+} + H^{+} \qquad A^{+} \underset{pK_R}{\rightleftharpoons} A^{\pm} + H^{+} \qquad A^{\pm} \underset{pK_2}{\rightleftharpoons} A^{-} + H^{+}$$

Le pH de la solution aqueuse est donné par le pH_i de l'histidine : l'acide aminé est sous la forme $A^{\pm}$:

d'où : $pK_R < pH_i < pK_2$;

avec : $pH_i = 1/2\,(pK_R + pK_2)$;

soit : $pH_i = 1/2\,(6 + 9{,}17) = 7{,}79$.

L'histidine en solution aqueuse peut être titrée soit par une base forte (hydroxyde de sodium), soit par un acide fort (acide chlorhydrique) *(fig. 6.4.)*.

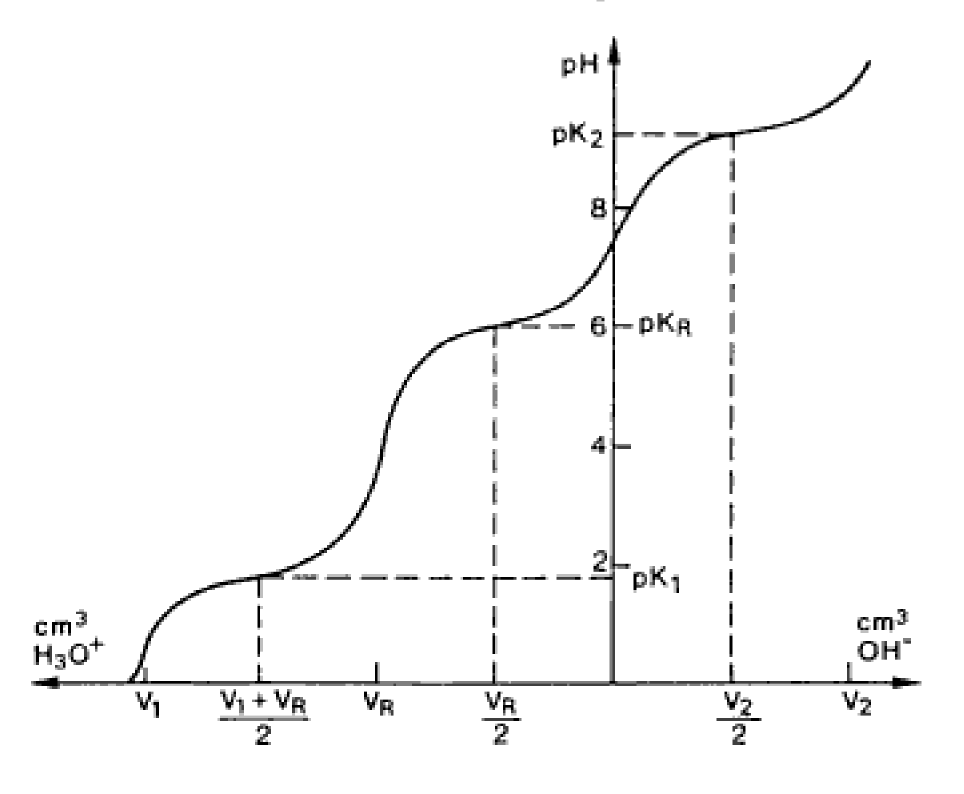


Fig. 6.4. Courbe de titrage de l'histidine

2. RÉACTIFS

- *Solution de glycine* de concentration molaire C ≈ 0,1 mol.dm^{-3}.
- *Solution d'arginine* de concentration molaire C ≈ 0,1 mol.dm^{-3}.
- *Solution d'acide aspartique* de concentration molaire C = 0,02 mol.dm^{-3} (l'acide aspartique est peu soluble : à 25 °C sa solubilité n'est que d'environ 0,78 g/100 g d'eau).
- *Solution d'histidine* de concentration molaire C ≈ 0,02 mol.dm^{-3}.
- *Solution d'acide chlorhydrique* de concentration molaire C ≈ 0,2 mol.dm^{-3}.
- *Solution d'hydroxyde de sodium* de concentration molaire C ≈ 0,2 mol.dm^{-3}.
- *Solution d'hydroxyde de sodium* de concentration molaire C ≈ 0,05 mol.dm^{-3}.
- *Solution tampon* pour la standardisation du pHmètre.

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Formoltitration de la glycine – méthode de Sörensen

Dans un bécher de 100 cm^3 introduire 10 cm^3 d'une solution de méthanal à 40 % en volume.

Les solutions commerciales de méthanal contiennent de l'acide méthanoïque. Il est nécessaire de les amener à pH 6 (pH_i de la glycine) par addition d'hydroxyde de sodium (compte-gouttes) très diluée (≈ 0,05 mol.dm^{-3}).

Ajouter E = 20 cm^3 de solution de glycine à doser.

Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire C = 0,2 mol.dm^{-3}.

REMARQUE : en raison des risques toxiques du méthanal (ou formol) il est important de rappeler quelques consignes de sécurité :
- *travailler loin de toute source de chaleur ou de flamme ;*
- *stocker le produit dans un récipient fermé ;*
- *ne pas pipetter à la bouche ;*
- *ne pas inhaler ;*
- *éviter le contact avec la peau ;*
- *travailler dans une pièce ventillée ;*
- *ne pas jeter du méthanal (formol) dans l'évier.*

3.2. Courbe de titrage de l'arginine

Dans un bécher de 100 cm^3, introduire E = 20 cm^3 ou 25 cm^3 de la solution d'arginine à doser.

Mettre en marche l'agitateur magnétique.

Titrer par la solution d'acide chlorhydrique de concentration molaire C = 0,2 $mol.dm^{-3}$.

3.3. Courbe de titrage de l'acide aspartique

Dans un bécher de 100 cm^3, introduire E = 20 cm^3 ou 25 cm^3 de solution d'acide aspartique à doser.

Mettre en marche l'agitateur magnétique.

Titrer par la solution d'acide d'hydroxyde de sodium de concentration molaire C = 0,05 $mol.dm^{-3}$.

3.4. Courbe de titrage de l'histidine

Dans un bécher de 100 cm^3, introduire E = 20 cm^3 ou 25 cm^3 de solution d'histidine à doser.

Mettre en marche l'agitateur magnétique.

Verser de l'acide chlorhydrique au compte-gouttes jusqu'à abaisser le pH à 2.

Titrer ensuite par la solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire C = 0,05 $mol.dm^{-3}$.

REMARQUE : Les solutions d'hydroxyde de sodium se carbonatent très rapidement surtout quand elles sont peu concentrées.
On peut étalonner une des solutions titrantes par pesée de produit R P (par exemple l'hydroxyde de sodium de concentration molaire voisine de 0,2 $mol.dm^{-3}$ par pesée d'acide oxalique $(COOH)_2$, $2H_2O$ pur, ou d'hydrogénophtalate de K pur et anhydre). Les 2 autres

solutions titrantes seront : 1) préparée par dilution exacte, au 1/4 : hydroxyde de sodium à environ 0,05 mol.dm^{-3} ; 2) dosée par étalonnage volumétrique : solution d'acide chlorydrique à environ 0,2 mol.dm^{-3} :

$$C_{HCl} = \frac{E_{NaOH} \cdot C_{NaOH}}{V_{HCl}}$$

3.5. Questions

1) Pour chaque acide aminé, tracer la courbe de titrage : pH = f(volume NaOH versé) ou pH = f(volume HCl versé).

2) Déterminer les points d'équivalence par la technique des tangentes parallèles *(fig. 6.5.)* :
– tracer deux tangentes à la courbe, parallèles et situées de part et d'autre du point d'inflexion (construction qui ne doit pas masquer le tracé graphique) ;
– tracer ensuite une parallèle, équidistante à ces deux tangentes. Son intersection avec la courbe pH = f(volume solution titrante) détermine le point d'équivalence.

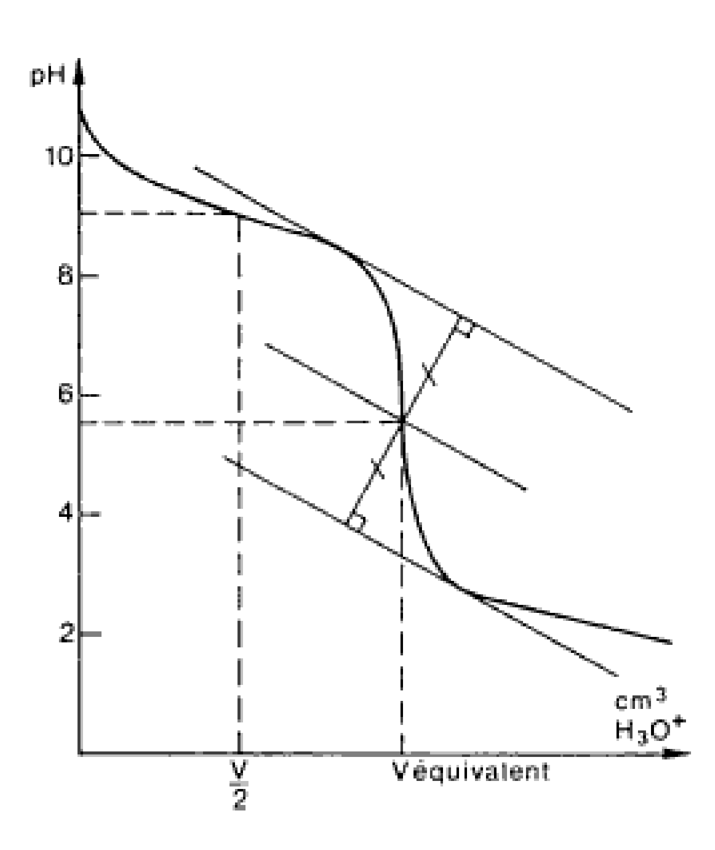


Fig. 6.5. Détermination du volume équivalent par la méthode des tangentes parallèles

Il est important que le tracé graphique soit précis de part et d'autre du point équivalent. Les volumes de solution titrante versés à la burette devront être petits dans cette zone de pH qui correspond à un « saut de pH » et à un point d'inflexion de la courbe :
- au niveau des pK : $0,5 \text{ cm}^3 < V_{\text{solution titrante}} < 1 \text{ cm}^3$;
- au niveau des points équivalents : $0,05 \text{ cm}^3 < V_{\text{solution titrante}} < 0,2 \text{ cm}^3$.

3) Dosage de la glycine :
- Déterminer graphiquement le volume équivalent (V), le pH de neutralisation et le pK'_2 du dérivé N-dihydroxyméthylé de la glycine.
- Calculer la concentration molaire de la solution de glycine, exprimée en $mol.dm^{-3}$.

$$C_{glycine} = \frac{C_{OH^-} \times V}{E_{glycine}}$$

4) Dosage de l'arginine :
- Déterminer graphiquement : le pH et le volume de neutralisation de la fonction α NH_2 (V) ; les pK des fonctions α aminée et α carboxylique.
- Calculer la concentration molaire de la solution d'arginine, exprimée en $mol.dm^{-3}$.

$$C_{arginine} = \frac{C_{H^+} \times V}{E_{arginine}}$$

5) Dosage de l'acide aspartique :
- Déterminer graphiquement : le pH et le volume de neutralisation de la fonction ß carboxylique ; les pK des fonctions ß carboxylique et α aminée.
- Calculer la concentration molaire de la solution d'acide aspartique, exprimée en $mol.dm^{-3}$.

$$C_{a\ aspartique} = \frac{C_{OH^-} \times V}{E_{a.aspartique}}$$

6) Dosage de l'histidine :
- Déterminer graphiquement : le pH et le volume de neutralisation de la fonction imidazole ; les pK des fonctions α carboxylique, imidazole et α aminée.
- Calculer la concentration molaire de la solution d'acide aspartique, exprimée en $mol.dm^{-3}$.

$$C_{histidine} = \frac{C_{OH^-} \times V}{E_{histidine}}$$

7) Comparer les capacités tampon des quatre acides aminés étudiés dans les conditions de pH des liquides intracellulaires et du sang.

4. ANNEXE

Fiche technique : le pHmètre. (Se reporter à l'annexe du chapitre 1 : « Préparation d'un tampon phosphate »).

5. EXERCICES

Exercice n° 1 : calculs de pHi

Qu'appelle-t-on le pHi d'un acide aminé ?
Ecrire les équilibres d'ionisation des acides aminés suivants et en déduire le calcul du pHi.

Acide aminé	*pK_1 α COOH*	*pK_2 α NH2*	*pK_R Chaîne latérale*
Sérine	2,21	9,15	
Cystéine	1,71	10,78	8,33
Tyrosine	2,20	9,11	10,07

Exercice n° 2 : courbes d'ionisation

Pour les trois acides aminés précédents, représenter sous forme de courbes le pourcentage des différentes formes ioniques en fonction du pH.

Exercice n° 3 : analyse de la courbe de titrage de l'alanine (extrait d'un sujet du concours général)

1) Du chlorhydrate d'alanine cristallisé est dissous dans de l'eau distillée, puis dosé par une solution d'hydroxyde de sodium.
On pose :

$$x = \frac{\text{quantité de NaOH versée}}{\text{quantité d'acide aminé présent}}$$

La *figure 6.6.* représente la variation du pH de la solution de chlorhydrate d'alanine en fonction de x.
Ecrire les équations chimiques correspondant aux différents temps du dosage.

Déterminer graphiquement les valeurs des pK_1 et pK_2 de l'alanine.
Calculer les valeurs des pH correspondant aux valeurs de x = 0 ; 1 et 2.
Comparer les résultats aux valeurs expérimentales. (La concentration molaire en alanine est voisine de 0,01 mol.dm $^{-3}$).

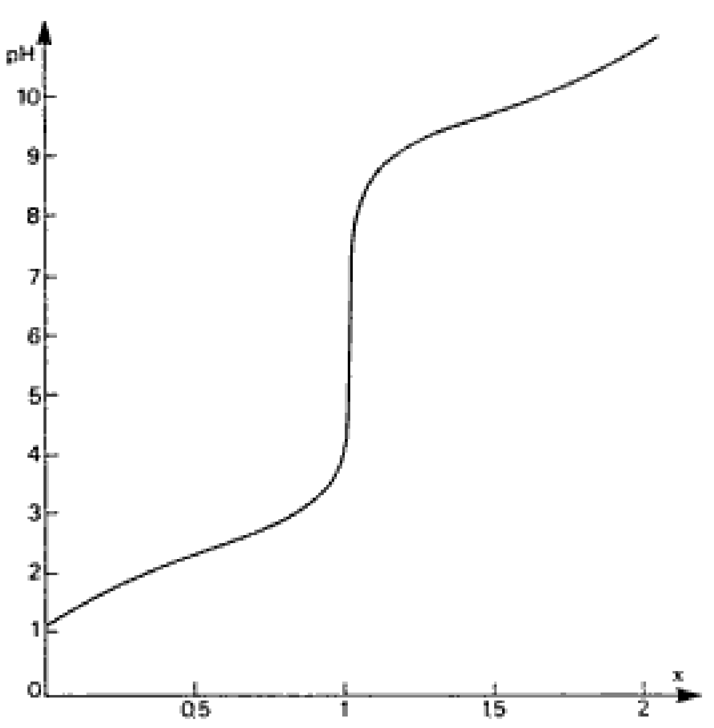


Fig. 6.6. Courbe de titrage d'une solution de chlorhydrate d'alanine par la soude

2) Une prise d'essai E = 10 cm^3 d'une solution S d'alanine est introduite dans un vase à titration. La mesure du pH indique alors pH = 6. On additionne alors un excès de solution commerciale de méthanol (formol) ; le pH chute à 3,9. Interprétrer qualitativement cette observation. On verse alors à la burette une solution d'hydroxyde de sodium, exactement 0,02 mol.dm $^{-3}$. Les valeurs de pH lues en fonction des volumes V cm^3 de NaOH versés sont consignés dans le *tableau 6.I.* Tracer la courbe pH = f (V cm^3). En déduire les points remarquables. Calculer la concentration molaire $C_{alanine}$ de la solution S en moles d'alanine par dm^3.

Tableau 6.I.

Volume de NaOH versé (en cm^3)	*pH*	*Volume de NaOH versé (en cm^3)*	*pH*
0	3,9	10	8,9
2	4,9	10,05	9,7
4	5,3	10,1	10
6	5,6	10,2	10,3
8	6,1	10,5	10,7
9	6,45	11	11
9,5	6,8	12	11,3
9,8	7,2	13	11,4
9,9	7,5	14	11,5
9,95	8,2	15	11,6

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

1) pH pour lequel la charge nette est nulle.
2)

$$\text{Sérine : } A^{+} \underset{H^{+}}{\overset{H^{+}}{\rightleftharpoons}} A^{\pm} \underset{H^{+}}{\overset{H^{+}}{\rightleftharpoons}} A^{-}$$

pK_1 pK_2

$pHi = 1/2\ (\ pK_1 + pK_2\ ) = 5{,}68$

$$\text{Cystéine : } A^{+} \underset{H^{+}}{\overset{H^{+}}{\rightleftharpoons}} A^{\pm} \underset{H^{+}}{\overset{H^{+}}{\rightleftharpoons}} A^{-} \underset{H^{+}}{\overset{H^{+}}{\rightleftharpoons}} A^{2-}$$

pK_1 pK_R pK_2

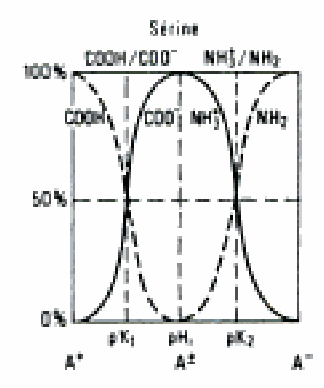
$pHi = 1/2\ (\ pK_1 + pK_R\ ) = 1/2\ (1{,}71 + 8{,}33) = 5{,}02$

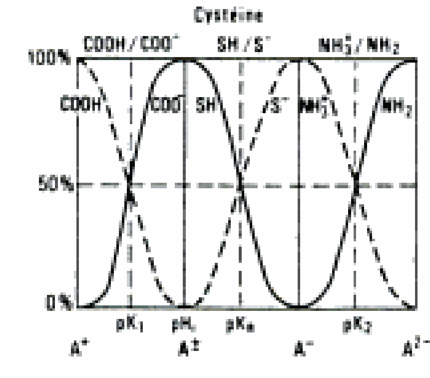
$$\text{Tyrosine : } A^{+} \underset{H^{+}}{\overset{H^{+}}{\rightleftharpoons}} A^{\pm} \underset{H^{+}}{\overset{H^{+}}{\rightleftharpoons}} A^{-} \underset{H^{+}}{\overset{H^{+}}{\rightleftharpoons}} A^{2-}$$

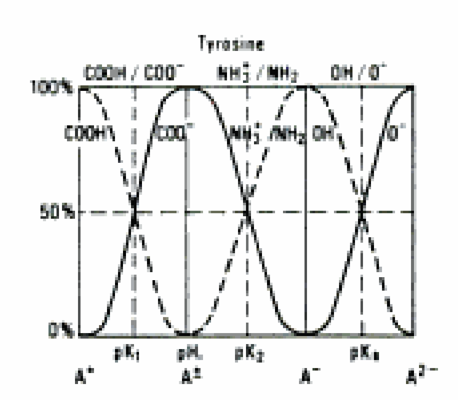
pK_1 pK_2 pK_R

$pHi = 1/2\ (\ pK_1 + pK_2\ ) = 1/2\ (2{,}20 + 9{,}11) = 5{,}65$

Exercice n° 2 :







Exercice n° 3 :

1)

$$\underset{\displaystyle CH_3}{HOOC{-}CH{-}NH_3^+}, Cl^- \xrightarrow{H_2O} \underset{\displaystyle CH_3}{HOOC{-}CH{-}NH_3^+} + Cl^-$$

$$\underset{\displaystyle CH_3}{HOOC{-}CH{-}NH_3^+} + OH^- \longrightarrow \underset{\displaystyle CH_3}{{}^-OOC{-}CH{-}NH_3^+} + H_2O$$

$$\underset{\displaystyle CH_3}{{}^-OOC{-}CH{-}NH_3^+} + OH^- \longrightarrow \underset{\displaystyle CH_3}{{}^-OOC{-}CH{-}NH_2} + H_2O$$

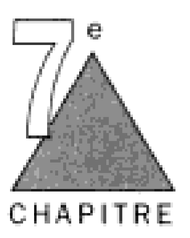
Déterminations graphiques :
- pour $X = 0,5 \rightarrow pK_1 \approx 2,35$
- pour $X = 1,5 \rightarrow pK_2 \approx 9,72$

Calculs :
- pour X = 0 $pH = 1/2\ (pKa - \log C)$
  $pH = 1/2\ (2,35 - \log 10^{-2}) = 4,35/2 = 2,17$
- pour X = 1 $pH = pH_i = 1/2\ (pK_1 + pK_2)$
  $pH = 1/2 \times 12,07 = 6,03$
- pour X = 2 $pH = 1/2\ (pK_2 + pK_e + \log C) = 1/2\ (9,72 + 14 - 2)$
  $pH = 10,86$

Aux pH extrêmes, les valeurs expérimentales ne correspondent plus aux valeurs calculées (pH 2,17, pH 10,89) : cf. chapitre 1.

2) En présence de méthanal, on obtient un acide plus fort :

$$C_{alanine} = \frac{C_{OH^-} \times Veq}{E} = \frac{0,02 \times 10}{10} = 0,02\ mol.dm^{-3}$$



DOSAGE DES IONS PHOSPHATES PAR COLORIMÉTRIE

SOMMAIRE

PAGE

En industrie agro-alimentaire, le dosage colorimétrique du complexe phospho-vanadomolybdique (méthode de Misson) est souvent utilisé. Mais, pour les faibles concentrations en élément phosphore (de l'ordre de quelques mg.dm $^{-3}$ – lors de l'analyse des eaux, par exemple), il faut utiliser le dosage, plus sensible, du complexe phosphomolybdeux – molybdique (méthode de Briggs par exemple).

En analyses médicales, les techniques procédant par réduction du complexe phosphomolybdate ou par dosage colorimétrique du complexe phosphovanado-molybdique sont de plus en plus abandonnées au profit des techniques directes avec lecture à 340 nm.

Méthode de Misson

1. PRINCIPE

En présence d'une solution acide de molybdate et de vanadate d'ammonium, les ions phosphates conduisent à la formation d'un complexe jaune intense : le *complexe phospho-vanadomolybdique* $[(NH_4)_3 PO_4 - NH_4VO_3 - 16 MoO_3]$.

On opère en milieu nitrique, chlorhydrique ou sulfurique ($[H_3O^+]$ = 0,5 à 0,9 mol.dm $^{-3}$).
La coloration se développe alors rapidement.
Le réactif de Misson ou réactif nitro-vanadomolybdique, est réalisé par mélange d'une solution de molybdate d'ammonium et d'une solution nitrique de vanadate d'ammonium (cf. § 2.1.).

Le maximum d'absorption du complexe est situé dans l'ultra-violet à 315 nm, puis l'absorption décroît régulièrement quand la longueur d'onde augmente. Le réactif nitro-vanadomolybdique absorbe lui-même notablement jusqu'à 420-430 nm. La colorimétrie est donc réalisée à une longueur d'onde légèrement supérieure 460-470 nm.

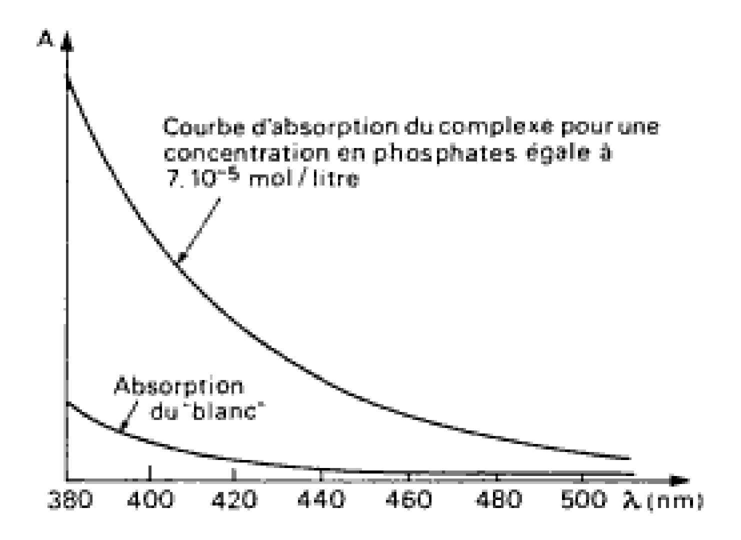


Fig. 7.1. Spectres d'absorption du complexe phospho-vanadomolybdique et du réactif nitro-vanadomolybdique

Les substances susceptibles de précipiter avec le réactif de coloration doivent être éliminées : c'est le cas des protéines.
Des ions peuvent interférer sur le dosage (par exemple : Fe III).

Limite de linéarité : 2.10^{-3} mol d'ions phosphates par dm^3 de milieu réactionnel.

Cette méthode simple et rapide manque toutefois de sensibilité.

2. DOSAGE DES PHOSPHATES URINAIRES

Le phosphore minéral urinaire se trouve sous forme d'ions monohydrogénophosphates (HPO_4^{2-}) et sous forme d'ions dihydrogénophosphates ($H_2PO_4^-$).

Pour un sujet en équilibre acido-basique :

$$\text{Dans l'urine : } \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \approx 1/63 \text{ alors que dans le plasma } \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \approx 4$$

L'excrétion des phosphates diminue avec l'âge.

2.1. Réactifs

- *Réactif nitro-vanadomolybdique :*

– solution A : dissoudre 40 g de molybdate d'ammonium dans 400 cm^3 d'eau distillée ;
– solution B : dissoudre 1 g de vanadate d'ammonium dans 300 cm^3 d'eau distillée et 200 cm^3 d'acide nitrique concentré. Laisser refroidir ;
– solution prête à l'emploi : dans une fiole jaugée de 1 dm^3, verser d'abord la solution B puis la solution A ; compléter à un dm^3 et laisser reposer huit jours avant l'utilisation.

- *Dihydrogénophosphate de potassium pur pour analyses* et anhydre (KH_2PO_4 masse molaire = 136,09 $g.mol^{-1}$) ou une solution aqueuse à 2,040 g de KH_2PO_4 par $.dm^3$.

- *Urine à analyser.*

2.2. Fiche technique

Il est recommandé de traiter en même temps l'urine et les étalons.

2.2.1. Dosage de l'urine

- Homogénéiser l'urine par agitation puis la diluer au 1/20 avec de l'eau distillée.

- Dans un tube à essais, introduire :

– urine diluée : 5 cm^3 ;
– réactif nitro-vanadomolybdique (distributeur) : 5 cm^3.

Attendre 5 minutes puis lire l'absorbance à 470 nm contre un « témoin réactif » ou éventuellement contre un « témoin urine » (urine foncée).

Si l'absorbance de l'essai est supérieure à celle des étalons, recommencer le dosage en diluant l'urine au 1/40.

2.2.2. Etalonnage du spectrophotomètre

A partir d'une solution à 2,040 g dm^{-3} de dihydrogénophosphate de potassium, réaliser une gamme d'étalonnage contenant de 1,5 à 7,5 µmol de P par tube.
Traiter les étalons de la même façon que l'urine diluée.
Lire les absorbances à 470 nm contre un « témoin réactif ».

2.3. Questions

1) Donner le tableau de composition des tubes.

2) Tracer la courbe d'étalonnage : A = f(qs P en µmol) ou utiliser la régression linéaire.

3) Calculer la quantité de phosphates urinaires éliminée en 24 heures : dU-phosphates : (qs) en mmol ; (qm) en g de P.

Données :

- $K = 39,1\ g.mol^{-1}$; $P = 31\ g.mol^{-1}$; $H = 1\ g.mol^{-1}$; $O = 16\ g.mol^{-1}$;
- diurèse du patient : 1 750 cm^3 en 24 h ;
- intervalle de référence : dU – Phosphate (qs) 22 – 42 mmol ;
  dU – Phosphate (qm en P) 0,7-1,3 g

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Tableau de composition des tubes

Tableau 7.I.

	N° des tubes	$T_{réactif}$	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	T_{urine}	*Dosage*
(2)	Solution étalon à 1,5 $\mu mol.cm^{-3}$ (cm^3)	0	1	2	3	4	5	0	0
	Urine diluée au 1/20 (cm^3)	–	–	–	–	–	–	5	5
(3)	H_2O distillée (cm^3)	5	4	3	2	1	0	–	–
	Réactif de Misson (cm^3)	5	5	5	5	5	5	5	5
(1)	P qs en µmol	0	1,5	3	4,5	6	7,5	0	X

Conseils :

Construire le tableau de composition des tubes *(tabl. 7.I.)* en vérifiant que les lignes (1) et (2) forment des séries proportionnelles. Compléter (3). Finir de remplir le tableau.

Calculer la concentration de la solution étalon nécessaire pour préparer les tubes étalons : tube n° 1 : 1,5 $\mu mol.cm^{-3}$.

La solution étalon à 1,5 $\mu mol.cm^{-3}$ est obtenue par dilution au 1/10 de la solution à 2,040 $g.dm^{-3}$ (soit 2,040 / 136,09 = 0,015 $mol.dm^{-3}$).

2.3.2. Calculs

$$\text{dU quantité de substance (qs) en mmol} = \frac{X}{5} \times 20 \times 1{,}750$$

(X est la quantité de P, exprimée en µmol., présente dans la cuve « dosage »).

Méthode de Briggs

1. PRINCIPE

En présence d'un excès de solution acide de molybdate d'ammonium (réactif sulfomolybdique : molybdate d'ammonium et acide sulfurique), les ions phosphates conduisent à la formation d'un complexe phosphomolybdique $H_3PO_4 - (MoO_3)_{12}$.
Par addition d'un réducteur, le complexe est réduit en complexe phosphomolybdeux molybdique $H_3PO_4 - [(MoO_3)_4\ MoO_2]_2$.
Ce composé est stable et soluble dans l'eau. Il est intensément coloré en bleu : le maximum d'absorption se situe vers 830 nm mais, en pratique courante, les absorbances sont mesurées à 700 nm.
L'absorbance suit la loi de Beer–Lambert pour les faibles concentrations en phosphates (jusqu'à environ 10 $\mu g.P.cm^{-3}$ dans le milieu réactionnel).

Le milieu doit être exempt de composés susceptibles de précipiter avec le réactif molybdique, d'où la nécessité de pratiquer une défécation préalable en présence d'acide trichloracétique, pour éliminer les protéines du sérum, du plasma, ou d'une urine albumineuse.

Un certain nombre d'ions peuvent interférer dans ce dosage comme As(V) et Si(IV) qui donnent une coloration analogue, Sn(IV) et Bi(III) lesquels conduisent à la formation de précipités entraînant du phoshore, Cu(II), Ni(II et Cr(III) qui gênent par leur couleur.

Il convient d'éviter la réoxydation du complexe molybdeux-molybdique et la réduction de l'excès de réactif molydique en « bleu de molybdène » qui absorbe surtout vers 630 nm.

De ce principe découlent plusieurs techniques opératoires qui diffèrent par la nature du réducteur (hydroxylamine, fer ferreux, p.méthylaminophénol...) ou par les conditions de développement de la coloration (témpérature, durée).

La méthode de Briggs représente l'une de ces variantes : le réducteur utilisé est un mélange d'hydroquinone et de sulfite de sodium.

Il s'agit d'une méthode très sensible.

2. DOSAGE DES PHOSPHATES SÉRIQUES

Le phosphore minéral du plasma se trouve sous forme d'ions monohydrogénophosphates (HPO_4^{2-}) et d'ions dihydrogénophosphates ($H_2PO_4^-$).

Le sang est prélevé sur tube sec (dosage sur sérum) ou sur anticoagulant, héparinate de lithium (dosage sur plasma) et centrifugé aussitôt en évitant l'hémolyse.

Le dosage doit être réalisé dans les deux heures qui suivent le prélèvement pour éviter l'hydrolyse enzymatique des esters phosphoriques du sang.

Consignes de sécurité à respecter pour la manipulation de sérum humain (cf. chapitre 11 § 3).

2.1. Réactifs

- *Sérum à doser* (sérum animal = sérum de bœuf).
- *Acide trichloracétique à 200 g.dm^{-3}.*
- *Réactif sulfomolybdique.* Dans un bécher de 50 cm^3, introduire :

– molybdate d'ammonium : 25 g ;
– eau distillée : 125 cm^3.

Dissoudre. Tiédir éventuellement. Laisser refroidir et ajouter :
– eau distillée : 125 cm^3 ;
– acide sulfurique pur : 75 cm^3.
Homogénéiser. Ce réactif ne pose pas de problème de conservation.

- *Hydroquinone à 10 g.dm^{-3}* : solution aqueuse à préparer extemporanément.

On peut retarder l'oxydation par l'addition de 4 gouttes d'acide sulfurique concentré et conserver la solution à 4 °C. Il faut renouveler la solution dès qu'un jaunissement apparaît.

- *Sulfite de sodium à 200 g.dm^{-3}* : solution aqueuse à conserver en flacons bien bouchés et à renouveler fréquement.

- *Dihydrogénophosphate de potassium pur pour analyses et anhydre (KH_2PO_4 masse molaire = 136,09 g.mol^{-1})* ou solution étalon phosphate à 2,722 g dm^{-3} de dihydrogénophosphate de potassium.

2.2. Fiche technique

2.2.1. Dosage

Défécation

Dans un tube à centrifuger, introduire :
- sérum à doser : 2 cm^3 ;
- eau distillée : 6 cm^3 ;
- acide trichloracétique à 200 $g.dm^{-3}$: 2 cm^3.

Agiter. Boucher. Laisser reposer une minute. Centrifuger pendant 10 minutes à 5 000 $tours.min^{-1}$. Pratiquer immédiatement la réaction colorée.

Réaction colorée

Dans un tube à essais, introduire :
- défécat : 2 cm^3 ;
- eau distillée : 5 cm^3 ;
- réactif sulfomolybdique : 1 cm^3 ;
- hydroquinone à 10 $g.dm^{-3}$: 1 cm^3 ;
- sulfite de sodium à 200 $g.dm^{-3}$: 1 cm^3.

Homogénéiser. Attendre 20 à 30 minutes, à l'obscurité. Lire à 700 nm contre un témoin réactif.

2.2.2. Etalonnage de l'appareil

A partir d'une solution étalon à 2,722 g dm^{-3} de dihydrogénophosphate de potassium, préparer une gamme d'étalons contenant entre 0 et 2 µmol de phosphore par tube.

2.2.3. Questions

1) Tracer la courbe d'étalonnage ou utiliser la régression linéaire.

2) Déterminer la phosphatémie du patient :
Se-phosphate – (substc) $mmol.dm^{-3}$
– (masc en P) $mg.dm^{-3}$

Données : valeurs de référence pour la phosphatémie :

– (Ad) Pl-phosphate	(substc)	0,98 – 1,30 $mmol.dm^{-3}$
	(masc en P)	30 à 40 $mg.dm^{-3}$
– (E) Pl-Phosphate	(substc)	1,30 – 2,00 $mmol.dm^{-3}$
	(masc)	40 à 60 $mg.dm^{-3}$.

2.3. Technique

2.3.1. Tableau de composition des tubes à essais

Tableau 7.II.

N° des tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*Dosage*
Surnageant de centrifugation (cm^3)	–	–	–	–	–	2
Solution étalon à 1 $mmol.dm^{-3}$ (cm^3)	–	0,5	1	1,5	2	–
H_2O distillée (cm^3)	7	6,5	6	5,5	5	5
Réactif sulfomolybdique (cm^3)	1	1	1	1	1	1
Hydroquinone à 10 $g.dm^{-3}$ (cm^3)	1	1	1	1	1	1
Sulfite de sodium à 200 $g.dm^{-3}$ (cm^3)	1	1	1	1	1	1
P qs µmol	0	0,5	1	1,5	2	X_p

La solution étalon mère est à 2,722 g de KH_2PO_4 par dm^3, soit de concentration molaire égale à 0,02 $mol.dm^{-3}$ ou 20 $mmol.dm^{-3}$.

La solution étalon nécessaire pour la composition des tubes de gamme est à 1 $µmol.cm^{-3}$, soit 1 $mmol.dm^{-3}$. On l'obtient par dilution au 1/20 de la solution étalon mère.

2.3.2. Calculs

Le défécat dosé correspond à une dilution au 1/5 du sérum analysé.

$$\text{Se-phosphate (substc) } mmol.dm^{-3} = \frac{X_p}{2} \, . \, 5 = 2,5\ X_p$$

$$\text{Se-phosphate (masc. en P) } mg.dm^{-3} = \frac{X_p}{2} \times 5 \times 31 = 77,5\ .\ X_p$$

(X_p étant la quantité de P, exprimée en µmol, présente dans la cuve « dosage »).

EXERCICES

Exercice n° 1 : dosage du phosphore du lait

1) A partir d'une solution à 4,619 $g.dm^{-3}$ de monohydrogénophosphate de sodium dodécahydraté (Na_2HPO_4, 12 H_2O) pur, on prépare une solution étalon à 20 mg de phosphore par dm^3.

Composition du tube témoin :
– 7 cm^3 d'eau distillée ;
– 1 cm^3 de réactif molybdique ;
– 1 cm^3 d'hydroquinone à 1 % ;
– 1 cm^3 de sulfite de sodium à 20 %.

2) Dans un tube à centrifuger, on met :
– 1 cm^3 de lait reconstitué à raison de 100 g de lait en poudre par dm^3 de lait reconstitué ;
– 7 cm^3 d'eau distillée ;
– 2 cm^3 d'acide trichloracétique à 30 %.
On mélange. Après 5 minutes d'attente, on centrifuge 10 min. à 5 000 $tours.min^{-1}$.
La réaction colorée est réalisée sur 2 cm^3 de surnageant dans les mêmes conditions que les tubes de la gamme.

Questions

1) Donner la préparation de la solution étalon à 20 $mg.dm^{-3}$ à partir de la solution de Na_2HPO_4.

2) Donner un tableau de composition des tubes.

3) Etablir la formule littérale donnant la concentration massique en phosphore du lait reconstitué, exprimée en $g.dm^{-3}$.

4) Etablir la formule littérale donnant la masse de phosphore dans 100 g de lait en poudre.
(Soit X la masse de P présente dans la cuve dosage).

Données : Na = 23 $g.mol^{-1}$; P = 31 $g.mol^{-1}$; O = 16 $g.mol^{-1}$; H = 1 $g.mol^{-1}$.

Exercice n° 2 : dosage du phosphore sérique (extrait BTS)

Dans un tube à centrifuger on met :
– 1 cm^3 de sérum ;
– 1 cm^3 de solution d'acide trichloracétique à 200 $g.dm^{-3}$;
– 3 cm^3 d'eau distillée.

On centrifuge. On reprend 1 cm^3 de surnageant auquel on ajoute 3 cm^3 de réactifs de coloration. On laisse 30 minutes à l'obscurité et on lit l'absorbance.

1) Sachant que la phosphorémie est d'environ 1 $mmol.dm^{-3}$, indiquer un tableau de préparation des tubes permettant de réaliser 4 étalons. Donner la concentration de la solution étalon utilisée.

2) Quelle masse de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 (M = 136,09 $g.mol^{-1}$) faut-il peser pour préparer 100 cm^3 de la solution étalon précédente ?

Une telle pesée est-elle envisageable en pratique ? Justifier la réponse et éventuellement, proposer un protocole de préparation.

Exercice n° 3 : dosage des phosphates urinaires

On prépare une gamme de 0 à 4 µmoles de phosphore par tube à partir d'une solution étalon de concentration massique exprimée en P_2O_5 égale à 1,136 $g.dm^{-3}$.

Le dosage de l'urine est réalisée de la manière suivante :
– urine diluée 5 cm^3 ;
– réactif de Misson 5 cm^3.

1) Donner un tableau de composition des tubes.

2) Quel est le coefficient de dilution de l'urine ?

Données dU – Phosphate (qm en P) = 1,0 g ;
diurèse (vol) ≈ 1,5 dm^3.

Exercice n° 4 : les phosphates sériques

• Sérum :
– Défécation : sérum, 2 cm^3 ; eau distillée, 6 cm^3 ; acide trichloracétique, 2 cm^3.
Homogénéiser puis centrifuger.

– Réaction colorée : surnageant, 5 cm^3 ; réactifs de coloration, 3 cm^3.

• Etalonnage de l'appareil : préparer une gamme étalon permettant de doser des hyperphosphatémies à 100 mg de phosphore par dm^3 au maximum.

1) Donner un tableau de composition des tubes.

2) Donner un mode opératoire pour la préparation de la solution étalon.

3) Quelle quantité approximative de phosphore obtiendrait-on dans le tube dosage, pour une phosphatémie normale ?

Données :

– Produit à peser : de Na_2HPO4, 12 H_2O pur pour analyses (Masse molaire = 358 $g.mol^{-1}$).
– (Ad) Pl-Phosphate (masc en P) = 30 à 40 $mg.dm^{-3}$.
– P = 31 $g.mol^{-1}$.

Exercice n° 5 : dosage des ions phosphates urinaires par la méthode de Misson

Tube essai : 5 cm^3 d'une urine diluée au 1/20 ; 5 cm^3 de réactif de coloration.

L'essai est lu contre un témoin réactif. Il a la même absorbance qu'un tube étalon contenant 200 µg de P et réalisé de la manière suivante :
- solution étalon : 4 cm^3 ;
- eau distillée : 1 cm^3 ;
- réactif de coloration : 5 cm^3.

1) Calculer la concentration urinaire, en phosphore, exprimée en $g.dm^{-3}$.

2) Quelle est la concentration massique de la solution étalon, exprimée en g de P par dm^3 ?

Cette solution étalon a été obtenue par dilution au 1/10 d'une solution de monohydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) préparée par pesée de produit pur pour analyses. Calculer la masse de produit pesée pour préparer U = 100 cm^3 de cette solution.

3) Calculer le coefficient d'absorption molaire (en $m^2.mol^{-1}$) du composé coloré dosé, sachant que l'absorbance du tube étalon est A = 0,36.

4) Quelle absorbance aurait-on mesurée, si l'on avait oublié de mettre 1 cm^3 d'eau dans le tube étalon ?

Exercice n° 6 : étude d'un mode opératoire de dosage des phosphates plasmatiques et urinaires par méthode colorimétrique sans déprotéinisation (extrait sujet BTS)

Fiche technique :

- *Solutions destinées au dosage :*

– R_1 : réactif réducteur
Chlorhydrate d'hydroxylamine (masse molaire = 69,49 $g.mol^{-1}$) : 0,14 $mol.dm^{-3}$.
Polyvinylpyrrolidone : 10 $g.dm^{-3}$.
Acide sulfurique : 89,63 $mmol.dm^{-3}$.

– R_2 : molybdate d'ammonium (masse molaire = 1 190,82 $g.mol^{-1}$) : 6,07 $mmol.dm^{-3}$.

– R_3 : hydroxyde de sodium (masse molaire = 40,00 $g.mol^{-1}$) : 4 $mol.dm^{-3}$.

– R_4 : dihydrogénophosphate de potassium (solution S) : 1,0887 $g.dm^{-3}$.

On donne : P = 31 $g.mol^{-1}$ O = 16 $g.mol^{-1}$ H = 1 $g.mol^{-1}$ K = 39,1 $g.mol^{-1}$.

- *Protocole :*

– Echantillon (plasma ou urine diluée) : 0,4 cm^3.

– Réactif réducteur : 2 cm^3.

– Solution de molybdate d'ammonium : 2 cm^3.

Bien mélanger. Laisser 2 min. à température ambiante.
Ajouter : solution d'hydroxyde de sodium : 0,5 cm^3.
Mélanger. Placer 15 min. à 37 °C. Lire à 680 nm.

L'étalonnage est fait dans les mêmes conditions opératoires à partir de 4 solutions étalons : E1, E2, E3, E4 que l'on prépare à partir de la solution S, en vue d'introduire dans les tubes étalons respectivement : 0,256 ; 0,384 ; 0,512 ; 0,640 micromoles de phosphore.

Questions :

1) On prépare 100 cm^3 de chacun des trois réactifs R1, R2, R3.

Quelles masses doit-on peser :
- de chlorhydrate d'hydroxylamine ?
- de polyvinylpyrrolidone ?
- de molybdate d'ammonium ?
- d'hydroxyde de sodium ?

Quel volume d'acide sulfurique pur devrait-on prélever ? (pureté : 95 % M = 98,08 $g.mol^{-1}$; masse volumique : 1 834 $kg.m^{-3}$).
Comment en pratique, peut-on faire un tel prélèvement et quelles précautions doit-on prendre dans la manipulation de cette solution commerciale ?

2) Quelles sont les concentrations de E1, E2, E3, E4, exprimées en $mmol.dm^{-3}$?

Comment préparer 100 cm^3 de chacune de ces solutions étalons à partir de S ?

3) Sachant que l'urine renferme environ 2,3 $g.dm^{-3}$ de phosphates exprimés en P_2O_5, proposer une dilution de ce milieu biologique et préciser la quantité approximative correspondante de phosphore (exprimée en micromoles) dans le tube dosage.

4) Sachant que le résultat trouvé pour le plasma correspond au tube renfermant l'étalon E2, calculer la concentration du phosphore plasmatique en $mmol.dm^{-3}$, puis en $mg.dm^{-3}$.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 : dosage du phosphore du lait

1) Solution Na_2HPO_4 à 0,4 g P $.dm^{-3}$. Soit 400 mg. P. dm^{-3}
1/d = 20/400 = 1/20.

2) Lait dilué au 1/10.
Solution étalon à 20 mg $P.dm^{-3}$ soit 20 µg $P.cm^{-3}$.
Volume total dans chaque tube : 10 cm^3.

Tableau 7.III.

N° des tubes	0	1	2	3	4	5	Dosage
Surnageant (cm^3)	–	–	–	–	–	–	2
Solution étalon (cm^3)	0	1	2	3	4	5	–
H_2O distillée (cm^3)	7	6	5	4	3	2	5
Réactif (cm^3)	3	3	3	3	3	3	3
P (qs) µg	0	20	40	60	80	100	X

3) Concentration massique en g P.dm^{-3} de lait = X/2 x 10 x 10^{-3} = 5.10^{-3} X.

4) Lait reconstitué à raison de 100 g.dm^{-3}, d'où % masse = 5.10^{-3} X %.

Exercice n° 2 : dosage du phosphore sérique

1) Dilution du sérum : 1/5.

phosphorémie 1 mmol.dm^{-3} → 0,2 mmol.P dm^{-3}, soit 0,2 µmol P.cm^{-3} dans le surnageant. D'où gamme d'étalons contenant de 0 à 0,4 µmol P par tube.

Volume total dans chaque tube = 4 cm^3

Tableau 7.IV.

N° des tubes	0	1	2	3	4	Dosage
Surnageant (cm^3)	–	–	–	–	–	1
Solution étalon (cm^3) ou	0	0,2 0,25	0,4 0,5	0,6 0,75	0,8 1	–
H_2O distillée (cm^3) ou	1	0,8 0,75	0,6 05	0,4 0,25	0,2	–
Réactif (cm^3)	3	3	3	3	3	3
P qs µmol	0	0,1	0,2	0,3	0,4	X

2) Solution étalon à 0,5 µmol de P.cm^{-3}
m = 0,5 x 10^{-3} x 136,09 x 10^{-1} = 0,0068 g

ou solution étalon à 0,4 mmol de P.cm^{-3}
m = 0,4 x 10^{-3} x 136,09 x 10 – 1 = 0,0054 g.

Dans les deux cas, il faut peser 50 ou 100 fois plus, puis faire une dilution au 1/50 ou au 1/100 de la solution préparée par pesée pour préparer les tubes de gamme.

Exercice n° 3 : dosage des phosphates urinaires

Tableau 7.V.

N° des tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*Dosage*
Urine diluée (cm^3)	–	–	–	–	–	–	5
Solution étalon (cm^3)	0	1	2	3	4	5	–
H_2O distillée (cm^3)	5	4	3	2	1	0	–
Réactif (cm^3)	5	5	5	5	5	5	5
P qs µmol	0	0,8	1,6	2,4	3,2	4	X

1) Solution étalon du tableau : à 0,8 µmol. P cm^{-3}, soit 0,8 mmol. P dm^{-3}.
Solution étalon mère : (1,136/142) x 2 = 0,016 mol P.dm^{-3}, soit 16 mmol. P.dm^{-3}.
Dilution : 0,8/16 = 1/20.

2) dU ≈ 1,0 g d'où $[P]_{urine}$ = 1/31 x 1/1,5 ≈ 0,02 mol.dm^{-3}, soit 20 µmol P.cm^{-3}, soit 100 µmol P pour 5 cm^3 d'urine diluée.

Pour que le dosage tombe en milieu de gamme, dilution de l'urine = 2/100 ou 1/50.

Exercice n° 4 :

1) Dilution du sérum au 1/5.
Hyperphosphatémie à 100 mg P. dm^{-3} → 20 mg P. dm^{-3} après défécation.

Soit 20 µg P.cm^{-3} de surnageant. Soit 100 µg dans le tube dosage.
Faire une gamme d'étalons contenant de 0 à 100 µg P par tube.
Volume total dans chaque tube : 8 cm^3.

2) Solution étalon du tableau à 20 µg P. cm^{-3}.
m de Na_2HPO_4, 12 H_2O à peser pour préparer 100 cm^3 de solution étalon :
$20 \cdot 10^{-3} \times 1/31 \times 358 \times 10^{-1} = 0,0231$ g.
Il faut peser 10 ou 20 fois plus, puis diluer au 1/10 ou au 1/20 la solution préparée par pesée.

3) 30 à 40 µg dans le tube dosage.

Exercice n° 5 : dosage des phosphates urinaires : méthode de Misson

1) Urine P masc g.dm^{-3} : $\frac{200}{5} \times 20 \cdot 10^{-3} = 0,8$ g.dm^{-3}.

2) Solution étalon à 50 µg P.cm^{-3}. Soit 50 mg P.dm^{-3} ou 0,05 g P.dm^{-3}.
Solution de K_2HPO_4 à 0,5 g P.dm^{-3} :

$$m_{K2HPO4} = \frac{0,5}{31} \times 174,2 \times 10^{-1} = 0,281 \text{ g}$$

3) $A = 0,36 = \varepsilon C l$

$$\varepsilon = \frac{0,36}{\frac{200 \times 10^{-6}}{31} \times \frac{10^{3}}{10} \times 10^{3} \times 10^{-2}} = 55,8\ m^{2}.mol^{-1}$$

4) A = 0,40.

Exercice n° 6 : étude d'un mode opératoire de dosage des phosphates

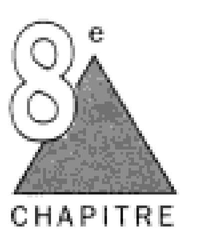
1) Chlorhydrate d'hydroxylamine : 0,973 g.
Polyvinylpyrrolidone : 1 g.
Molybdate d'ammonium : 0,723 g.
Hydroxyde de sodium : 16 g.
Acide sulfurique : concentration molaire volumique = 17,8 $mol.dm^{-3}$.
Volume à prélever = 89,63/17,8 x 0,1 = 0,5 cm^3.
Il faut prélever 5 cm^3 de solution commerciale diluée au 1/10.

2) $[E_1]$ = 0,256/0,4 = 0,64 $[E_2]$ = 0,384/0,4 = 0,96
$[E_3]$ = 0,512/0,4 = 0,128 $[E_4]$ = 0,640/0,4 = 1,6

Solution mère de KH_2PO_4 à 1,0887 · 10^3 / 136,1 = 8 $mmol.dm^{-3}$.
Volumes de soluton S à prélever : E_1 : 8 cm^3, E_2 : 12 cm^3, E_3 : 16 cm^3, E_4 : 20 cm^3 ; puis q s p à 100 cm^3.

3) L'urine renferme : (2,3 / 142) x 2 = 0,032 mol.P dm^{-3}, soit 12,8 µmol P pour 0,4 cm^3 d'urine non diluée.
Pour tomber en milieu de gamme 1/d = 0,5/12,8 = 1/25, d'où dilutions possibles = 1/20, au 1/25, au 1/50.
Quantité approximative de P, dans le tube dosage : 12,8/25 = 0,512 µmol.

4) Plasma : quantité de P dans le tube dosage = 0,384 µmol.
Concentration du P plasmatique : (0,384/0,4) x 10^3 = 0,96 $mmol.dm^{-3}$, soit :
0,96 x 31 = 29,8 $mg.dm^{-3}$.



SPECTRES D'ABSORPTION

SOMMAIRE

1. PRINCIPE

La spectrophotométrie d'absorption est très utilisée dans les laboratoires pour identifier des substances ou pour les doser.

Les mesures sont réalisées dans l'UV (180 nm < λ < 400 nm), le visible (400 nm < λ < 800 nm) ou le proche infrarouge (800 nm < λ < 1 000 nm) (*tabl. 8.I.*).

Tableau 8. I. : Radiations électromagnétiques

λ nm	0,01	100	400	800	15 000
Domaine spectral	Rayons X	Ultraviolet	Visible	Infrarouge	Micro-ondes
Mode d'absorption par les molécules et les atomes	transitions des électrons profonds	transitions des électrons périphériques	rotations et vibrations des molécules		rotations des molécules

1.1. Absorption dans l'infrarouge

L'absorption d'un rayonnement infrarouge correspond à une interaction des photons avec la molécule ou un groupement fonctionnel de la molécule, ce qui provoque une transition entre les états de vibrations de la molécule (vibration des atomes, vibration de valence...). L'énergie absorbée en fonction de la longueur d'onde donne un spectre de bandes étroites caractéristique de la substance analysée.

1.2. Absorption dans l'UV et dans le visible

L'absorption d'un rayonnement ultraviolet ou visible correspond à une interaction des photons avec les électrons des couches externes des atomes ou des molécules : les électrons σ et π des liaisons à l'intérieur de la molécule passent d'un état fondamental à un état exité.
L'énergie absorbée en fonction de la longueur d'onde donne un spectre de bandes larges.

Les molécules qui possèdent des doubles liaisons (–C=O ; N=N ; –N=O ; –C=C– ; –C=C–C=C–), des triples liaisons –C≡C–, des cycles aromatiques ou des hétérocycles absorbent dans l'UV lointain (160 nm à 220 nm) ou dans le proche UV (220 nm à 400 nm).

Certaines substances ayant une structure insaturée absorbent sélectivement dans le visible et apparaissent alors colorées (le permanganate de K, l'hémoglobine, le paranitrophénol...) (*tabl. 8.II.*).

Tableau 8. II. : Couleurs et longueurs d'onde correspondantes

Longueur d'onde (nm)	400		450		500		570		590		610		800
Couleur		violet		bleu		vert		jaune		orangé		rouge	

La mesure de l'absorbance d'une substance colorée se fait, si possible, à la longueur d'onde de la teinte complémentaire à la couleur. Par exemple l'absorbance d'une solution de permanganate de potassium violette est mesurée à λ = 540 nm (λ du maximum d'absorption ou λ_{max} du permanganate dans le visible), tandis que celle du paranitrophénol jaune est mesurée à 405 nm (λ_{max} du paranitrophénol dans le visible).

Il est possible de caractériser une substance en solution par son spectre d'absorption A = f (λ nm) connaissant les longueurs d'onde des maximums d'absorption (vitamines, coenzymes, acides aminés aromatiques...).

Certaines substances n'ont pas de spectre caractéristique en raison :
– de leur structure chimique simple : pas d'absorption en UV et dans le visible (glucides) ;
– du milieu complexe où elle se trouvent ;
– de leur concentration trop faible pour que l'on puisse mesurer A (si le coefficient spécifique d'absorption molaire ε est également petit).

Il faudra alors procéder :
– soit avec une réaction colorée spécifique, stable le temps du dosage et reproductible (dosages colorimétriques des phosphates, dosages des glucides...) ;
– soit par un dosage enzymatique faisant intervenir une réaction principale, éventuellement une ou des réactions auxiliaires et une réaction indicatrice avec par exemple consommation ou formation de NADH, H^+ et mesures d'absorbances en UV (dosages enzymatiques de l'alcool, du glucose, des triglycérides...) ;
– soit procéder à une extraction (entraînement par un solvant organique, par la vapeur d'eau) avant son dosage.

Le but de la manipulation est de tracer les spectres d'absorption du NAD^+ et du NADH, H^+ en solutions aqueuses, dans le domaine du proche UV.

2. RÉACTIFS

- *NAD^+ à peser* (nicotinamide adénine dinucléotide : $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$. Masse molaire = 663,44 g.mol^{-1}).
- *NADH, H^+ à peser* (dihydronicotinamide adénine dinucléotide disodique : NADH, Na_2 $C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}P_2$. Masse molaire = 709,42 g.mol^{-1}).
- *Tampon tris – HCl pH 7,40 0,1 mol.dm^{-3}*

Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

NH_2

$HOH_2C—C—CH_2OH$

CH_2OH

Préparer :
- Tris 0,2 mol.dm^{-3} (Masse molaire = 121,14 g.mol^{-1}) ;
- HCl 0,2 mol.dm^{-3}

Pour un litre de tampon :
- Tris 0,2 mol.dm^{-3} : 500 cm^3 ;
- HCl 0,2 mol.dm^{-3} : 444 cm^3 ;
- H_2O q s p : 1 000 cm^3.

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Préparation des solutions de NADH, H^+ et NAD^+

Préparer par pesées des solutions en tampon Tris-HCl de NADH, H^+ et de NAD^+ de concentrations molaires égales à 1.10^{-4} mol.dm^{-3}.

3.2. Enregistrement des spectres

Utiliser un spectrophotomètre à double faisceau muni d'un enregistreur et d'un défilement automatique des longueurs d'onde.

Préparer trois cuves appariées, propres, en quartz, de 1 cm de trajet optique. Remplir une des cuves avec de l'eau distillée, elle servira à régler le zéro optique (cuve référence) et les autres cuves avec les solutions de NADH, H^+ et de NAD^+ (cuves dosages).

Introduire la cuve référence et une des cuves dosages dans le porte-cuve.

Régler l'échelle des absorbances : $0 < A < 2$.

Régler le zéro en bout de l'échelle des longueurs d'onde.

Faire défiler les longueurs d'onde pour : $230 \text{ nm} \leq \lambda \leq 400 \text{ nm}$, à vitesse modérée, par exemple : 120 nm/min pour une avancée du papier de 60 mm/min ; soit finalement un défilement de 2 nm/mm.

Procéder de même avec la deuxième cuve dosage.

3.3. Questions

1) Annoter correctement les courbes (titre, échelles d'absorbance et de longueurs d'onde).

2) Sur les courbes enregistrées, déterminer, avec précision, les longueurs d'onde des maximums d'absorption : $\lambda 1$ et $\lambda 2$.

3) Compléter le tableau ci-dessous et commenter les résultats obtenus.

	NAD^+	NADH, H^+
$A\lambda 1$		
$A\lambda 2$		

4) Déterminer le pourcentage de pureté des produits pesés : NADH, H^+ et du NAD^+ solides.

Données :
– $\varepsilon_{\text{NADH, H+ à 340 nm}} = 630 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$
– $\varepsilon_{\text{NADH, H+ à 260 nm}} = \varepsilon_{\text{NAD+ à 260 nm}}$

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. Pesées de NADH, H⁺ et de NAD⁺

$m_{NADH,\ H+} = 0{,}0709$ g et $m_{NAD+} = 0{,}0663$ g pour U = 1 000 cm^3 de chacune des solutions aqueuses.

4.2. Pourcentage de pureté des produits pesés

Tableau de résultats :

	NAD^+	NADH, H^+
Aλ1	A_{1NAD+}	$A_{1NADH,H+}$
Aλ2	A_{2NAD+}	$A_{2NADH,H+}$

$$C_{NADH,\ H^+} \text{ en mol.dm}^{-3} = \frac{A_{2NADH,\ H^+}}{\varepsilon_{NADH,\ H^+ \text{ à } 340 \text{ nm}} \times 1} = \frac{A_{2NADH,\ H^+}}{6\ 300}$$

Concentration massique du NADH, H⁺ en g.dm⁻³ :

$$= \frac{A_{2NADH,H^+}}{6\ 300} \times M_{NADH,H^+} = \frac{A_{2NADH,H^+}}{6\ 300} \times 709{,}42$$

Pourcentage de pureté (% en masse) du NADH, H⁺ :

$$\frac{A_{2NADH,H^+}}{6\ 300} \times 709{,}42 \times \frac{100}{0{,}0709}$$

$$\varepsilon_{NAD^+ \text{ à } 260 \text{ nm}} (m^2\,mol^{-1}) = \varepsilon_{NADH,H^+ \text{ à } 260 \text{ nm}} (m^2\,mol^{-1}) = \frac{A_{1NADH,\ H+}}{C_{NADH,\ H+} \times 1 \times 10} = \frac{A_{1NADH,\ H+}}{A_{2NADH,\ H+}} \times 630$$

(Correction des unités)

$$C_{NAD^+} \text{ en } mol.dm^{-3} = \frac{A_{1NAD^+}}{\varepsilon_{NAD^+ \text{ à } 260 \text{ nm}} \times 1} = \frac{A_{1NAD^+}}{A_{1NADH,H}} \times \frac{A_{2NADH,H^+}}{630}$$

Concentration massique du NAD $^+$ en g.dm $^{-3}$:

$$\frac{A_{1NAD^+}}{A_{1NADH,H^+}} \times \frac{A_{2NADH,H^+}}{630} \times 663{,}44$$

Pourcentage de pureté (% en masse) du NAD $^+$:

$$\frac{A_{1NAD^+}}{A_{1NADH,H}} \times \frac{A_{2NADH,H^+}}{630} \times 663{,}44 \times \frac{100}{0{,}0663}$$

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Calculer la concentration massique d'une solution de riboflavine dans de l'acide chlorhydrique à 0,1 mol.dm $^{-3}$ dont l'absorbance mesurée à λ = 400 nm est de 0,680.

Données : Cuve de 1 cm de trajet optique. Le coefficient spécifique d'absorbance massique de la riboflavine en solution HCl à 0,1 mol.dm $^{-3}$ = 2,93 m^2 g^{-1} (à 20 °C).

Exercice n° 2 :

Le L tryptophane (masse molaire : 204 g.mol $^{-1}$) a un coefficient spécifique d'absorbance molaire de 56.10^3 l.mol $^{-1}$.cm $^{-1}$ à 279,8 nm (20 °C).

Calculer son coefficient spécifique d'absorbance massique pour la même longueur d'onde.

Exercice n° 3 :

Une solution d'acide folique et de riboflavine a une absorbance de 1,320 à λ = 260 nm et de 0,465 à λ = 370 nm.

Calculer la concentration des deux constituants sachant que :

– pour l'acide folique : $\varepsilon_{260\ nm} = 54{,}0\ m^2.g^{-1}$; $\varepsilon_{370\ nm} = 18{,}0\ m^2.g^{-1}$
– pour la riboflavine : $\varepsilon_{260\ nm} = 78{,}0\ m^2.g^{-1}$; $\varepsilon_{370\ nm} = 28{,}5\ m^2.g^{-1}$

(cuve de 1 cm de trajet optique)

Exercice n° 4 : (extrait sujet BTS)

Dans la cuve d'un spectrophotomètre (de trajet optique 1 cm) on ajoute à 1 cm^3 d'une solution S contenant un mélange de glucose-6-phosphate et de glucose-1-phosphate, 1,5 cm^3 d'un réactif renfermant un excès de $NADP^+$, de $MgCl_2$, de glucose-6-phosphate déshydrogénase. L'absorbance lue à 340 nm augmente de 0,47.

Puis on ajoute au contenu de la cuve 1,5 cm^3 d'une solution de phosphoglucomutase. L'absorbance augmente jusqu'à 0,60.

Déduire de ces expériences les concentrations molaires volumiques de la solution initiale en glucose–1–phosphate et en glucose–6–phosphate. Justifier les calculs effectués.

Données : $\varepsilon_{NADH,\ H+\ à\ 340\ nm} = 630\ m^2.mol^{-1}$.

Exercice n° 5 :

Une solution alcaline de paranitrophénol a été préparée de la manière suivante :

– solution de paranitrophénol à 12 $mg.dm^{-3}$: 5 cm^3 ;
– H_2O : 4 cm^3 ;
– solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 $mol.dm^{-3}$: 1 cm^3.

L'enregistrement du spectre d'absorption du paranitrophénol en solution alcaline a donné le graphe représenté sur la *figure 8.1*. (350 nm < λ < 500 nm).

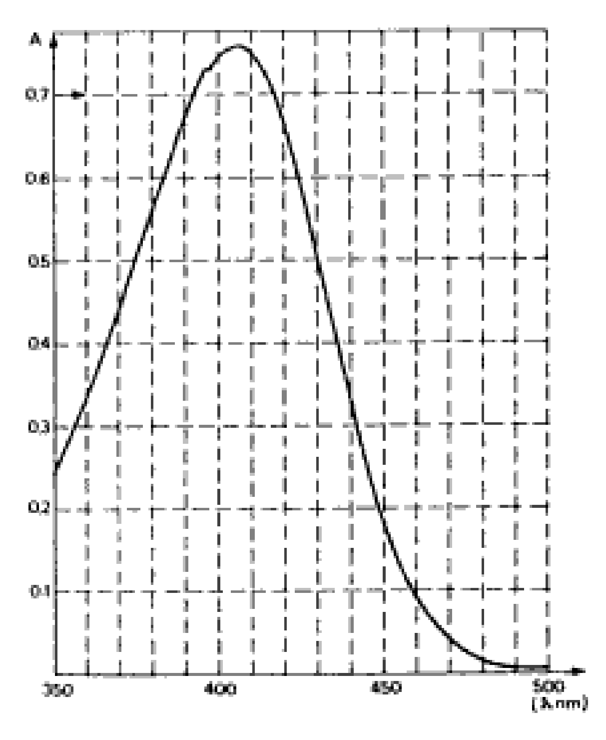


Fig. 8.1. Spectre d'absorption du pNP en solution alcaline

Calculer le coefficient spécifique d'absorption molaire du paranitrophénol (masse molaire M = 139,11 g.mol $^{-1}$), ε_{pNP} en m^2.mol $^{-1}$, au λ_{max}, dans les conditions du mode opératoire.

Exercice n° 6 : (extrait sujet d'examen)

1) Donner la définition de :
– la transmittance ou transmission T ;
– l'absorbance A (ou densité optique Do).

Calculer l'absorbance d'une solution dont la transmittance prend les valeurs successives suivantes : T = 0 % ; T = 1 % ; T = 10 % ; T = 50 % ; T = 100 %.

Le cadran d'un spectrophotomètre comporte deux échelles, l'une pour la transmittance, l'autre pour l'absorbance. Dessiner succinctement ces 2 échelles en les disposant de la façon suivante :



Commenter.

2) On dose une solution de permanganate de potassium par colorimétrie. A la longueur utilisée λ = 540 nm, A = 0,415.

– Pourquoi a-t-on utilisé cette longueur d'onde ?

– Calculer la concentration molaire de la solution sachant que le coefficient d'extinction molaire est égal à 2 160 cm $^{-1}$.(mol.l $^{-1}$) $^{-1}$ pour la longueur utilisée et que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm.
Quelle est la concentration massique en mg.l $^{-1}$ de la solution ?

Données : K = 39 g.mol $^{-1}$; Mn = 55 g.mol $^{-1}$; O = 16 g.mol $^{-1}$.

3) En fait, la solution contient un produit gênant de coefficient d'extinction molaire égal à 10^3.cm $^{-1}$.(mol.l $^{-1}$) $^{-1}$ et de concentration molaire égale à 10 $^{-6}$ mol.l $^{-1}$. Calculer la concentration réelle de la solution de permanganate de potassium.

Commenter.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

$$C = \frac{0{,}680}{2{,}93 \times 10^{-2}} \times 10^{-3} = 0{,}0232 \text{ g.dm}^{-3}$$

Exercice n° 2 :

$$\varepsilon = \frac{56.10^{3}}{204} = 275 \text{ l.g}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ soit : } 27{,}5 \text{ m}^{2}.\text{g}^{-1}$$

Exercice n° 3 :

$1{,}320 = 540 \times C_{acide\ folique} + 780 \times C_{riboflavine}$ (1)

$0{,}465 = 180 \times C_{acide\ folique} + 285 \times C_{riboflavine}$ (2)

De (1) et (2), on en déduit que $C_{acide\ folique} = C_{riboflavine} = 0{,}001$ g.dm^{-3}.

Exercice n° 4 :

$$\text{glucose–6–P} + \text{NADP}^{+} + H_2O \xrightarrow{\text{glucose–6–P déshydrogénase}} \text{acide 6 P gluconique} + \text{NADPH, H}^{+}$$

$$\text{glucose–1–P} \xrightarrow{\text{phosphoglucomutase}} \text{glucose–6–P}$$

$n_{NADH,\ H+}$ formées = $n_{glucose\ P\ oxydées}$

1) $$[\text{glucose–6–P}]_S = \frac{0{,}47 \times 10^{-3}}{630 \times 10^{-2}} \times \frac{2{,}5}{1} = 1{,}86.10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$$

2) $$[\text{glucose}] \text{ dans la solution S} = \frac{0{,}60 \times 10^{-3}}{630 \times 10^{-2}} \times \frac{4}{1} = 3{,}81.10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$$

$[\text{glucose–1–P}] = 3{,}81.10^{-4} - 1{,}86.10^{-4} = 1{,}95.10^{-4}$ mol.dm^{-3}

Exercice n° 5 :

- $\lambda_{max} = 405$ nm
- $A\lambda_{max} = 0{,}76 = \varepsilon_{405\ nm}.C.l$

$$\varepsilon_{406\,nm} = \frac{0{,}76}{\frac{12 \times 10^{-3}}{139{,}11} \times \frac{1}{2} \times 10^{3} \times 10^{-2}} = 1\ 762\ m^{2}.mol^{-1}$$

Exercice n° 6 :

1) $T = \phi / \phi_O \times 100$ $A = \log \phi_O / \phi$

$\phi_O / \phi = 10^A$ $\phi / \phi_O = 10^{-A}$

$T = \phi / \phi_O \times 100$	0 %	1 %	10 %	50 %	100 %
ϕ / ϕ_O	0	0,01	0,1	0,5	1
ϕ_O / ϕ	0	100	10	2	1
$A = \log \phi_O / \phi$		2	1	0,3	0

100 % 50 % 10 % 1 % 0 % T

0 0,3 1 2 A

2) λ_{max}

$C = 0{,}415/2160 = 1{,}921.10^{-4}$ mol.dm^{-3}

$\rho = 1{,}921.10^{-4} \times 158.10^{3} = 30{,}3$ mg.dm^{-3}

3) $A_{lue} = \varepsilon_{MnO4^-} \times C_{MnO4^-} \times 1 + \varepsilon_x \times C_x \times 1$

$$C_{MnO4^-} = \frac{A_{lue} - \varepsilon_x \times c_x \times 1}{\varepsilon_{MnO4^-}} = 1{,}92.10^{-4}\ mol.dm^{-3}$$

C_x = interfère peu sur le dosage du permanganate.



ANALYSE DE LA QUALITÉ D'UN SPECTROPHOTOMÈTRE

SOMMAIRE — PAGE

Les analyses biochimiques procèdent très souvent par spectrophotométrie. Il est important de vérifier périodiquement la qualité des mesures d'absorbance réalisées avec un spectrophotomètre, notamment si l'appareil sert à déterminer des activités enzymatiques : détermination qui exige la mesure précise d'une variation d'absorbance en fonction du temps.

Le but des manipulations proposées est de réaliser quelques tests simples et faciles de mise en œuvre, qui permettent à l'utilisateur d'un spectrophotomètre de vérifier les qualités de fonctionnement de l'appareil, dans le cadre strict de la *maintenance préventive.*

Ces contrôles ont pour objet :

- **le contrôle de la justesse d'affichage des longueurs d'onde et du monochromatisme ;**
- **le contrôle de l'exactitude et de la linéarité des absorbances ;**
- **le contrôle de la stabilité des absorbances.**



1. PRINCIPE

Les normes AFNOR T 01–030, T 01–033, T 01–036 définissent les qualités et les caractéristiques des spectrophotomètres ainsi que les méthodes de contrôle de performance des appareils *(fig. 9.1.)*.

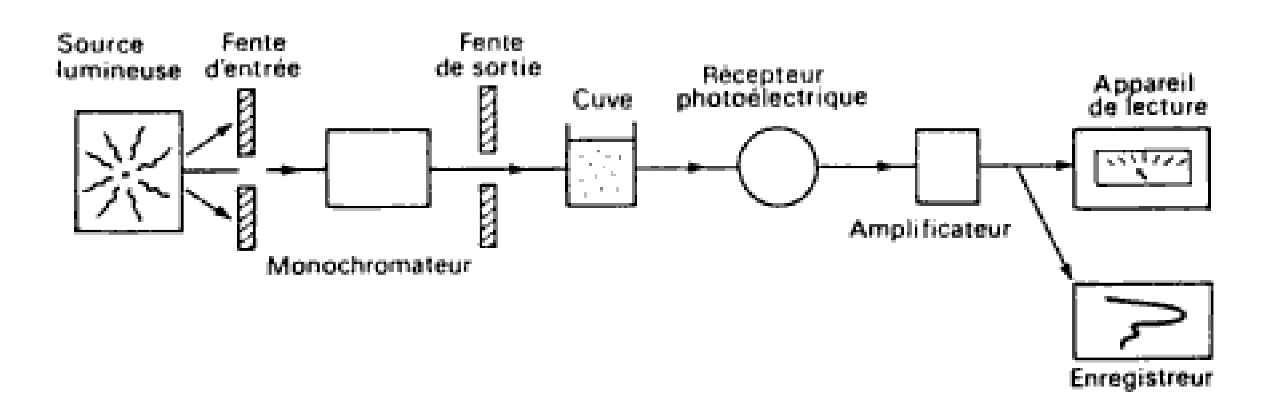


Fig. 9.1. Schéma de principe d'un spectrophotomètre d'absorption moléculaire

1.1. Dispositifs de production d'un faisceau de radiations

1.1.1. *Sources de radiations*

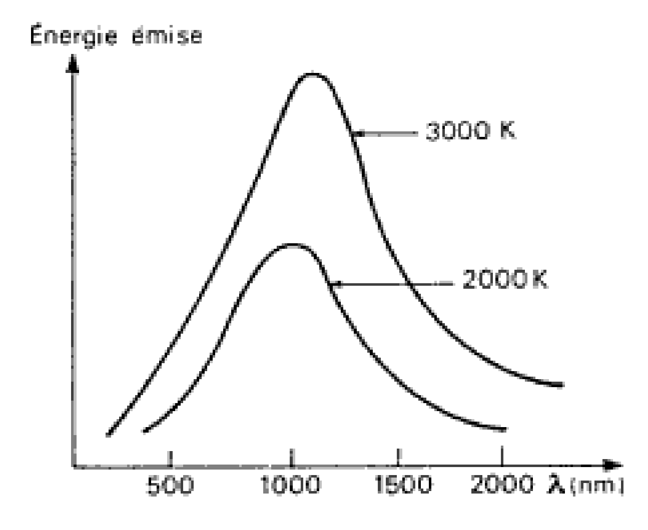
Les sources de radiations produisent un spectre d'émission caractéristique, qui couvre un domaine de longueurs d'onde plus ou moins étendu.

Les radiations sont émises :

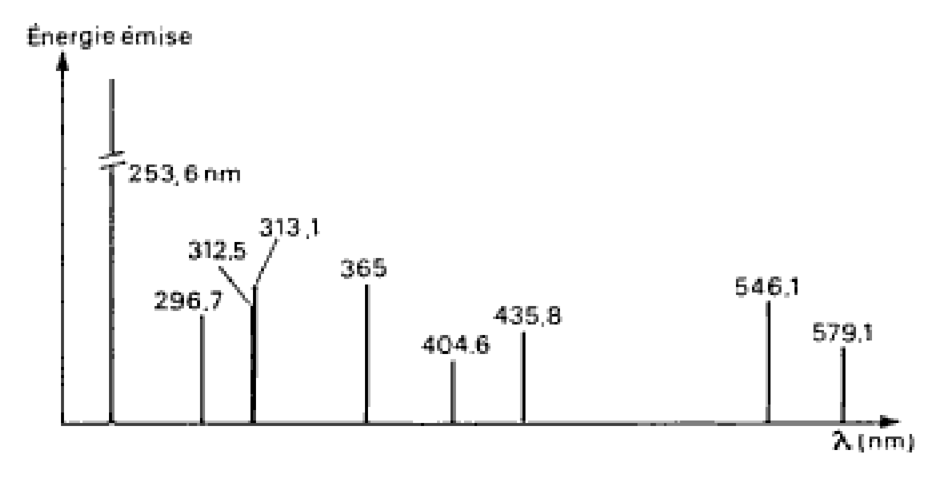
– *Par des solides chauffés :* une lampe à filament de tungstène émet un spectre continu dans le visible et le proche infrarouge.
Un filament de Nernst (formé d'oxydes frittés de zirconium, thorium et cérium) ou un filament de nichrome (fil résistant), chauffés électriquement émettent dans l'infrarouge.

– *Lors de décharges électriques dans des gaz raréfiés :* les lampes aux halogènes, les lampes à hydrogène ou au deutérium, émettent un spectre continu dans l'ultraviolet, alors que les lampes à vapeurs métalliques émettent un spectre de raies : comme la lampe à vapeur de mercure qui émet un spectre discontinu dans l'UV.

Un appareil peut posséder une ou plusieurs sources de radiations *(fig. 9.2.)*.



a. Spectre d'émission d'un filament de tungstène



b. Spectre de raies de la lampe à mercure

Fig. 9.2. Spectres d'émission de sources lumineuses – a. source continue ; b. source discontinue

1.1.2. Sélecteurs de radiations

Il s'agit du ou des dispositifs qui permettent d'isoler un faisceau de radiations à partir du spectre émis par la source de radiations.

Une fente d'entrée et une fente de sortie peuvent être associées à ces dispositifs. La pureté du faisceau de mesure dépend de la largeur de ces fentes.

On appelle *bande passante*, l'ensemble des radiations isolées par le sélecteur de radiations, à partir du spectre émis et ceci, pour une longueur d'onde nominale donnée.

Cette bande passante, d'allure généralement gaussienne, est caractérisée par sa largeur en longueur d'onde à mi-hauteur de la courbe : c'est la largeur de la bande passante exprimée en nm. Dans le cas d'une bande passante étroite, le sélecteur de radiations est appelé « monochromateur » (prismes, réseaux).

Nature des sélecteurs de radiations

– *Les filtres absorbants :* en verre ou en gélatine, ils absorbent sélectivement certaines radiations. Ils sont caractérisés par la longueur d'onde à laquelle la transmission est maximale et par leur bande passante, large : 20 nm et plus.
Il s'agit de sélecteurs à variation discontinue de longueur d'onde. Il faut intercaler un filtre sur le trajet du faisceau de radiations en fonction de la longueur d'onde de travail.

– *Les filtres interférentiels :* ils résultent de l'empilement de lames de verre recouvertes de fines couches métalliques.
Quand un rayon lumineux traverse l'ensemble, des interférences de radiations se produisent, avec une absorption plus ou moins grande de la lumière pour certaines longueurs d'onde et une transmission maximale pour d'autres longueurs d'onde.

– *Les prismes et les réseaux :* les réseaux ont remplacé progressivement les prismes. Ils peuvent être formés d'une lame de verre striée, mais plus souvent de métal portant des raies fines et parallèles.
Un réseau fournit à partir d'une lumière blanche des spectres de diffraction. Le pouvoir de résolution du réseau est supérieur à celui du prisme.
Les prismes, les réseaux et les filtres interférentiels réglables sont des sélecteurs à variation continue de longueur d'onde. Les différentes radiations qu'ils séparent peuvent défiler de façon continue.

1.1.3. Les principaux types de spectrophotomètres

En fonction du dispositif de sélection des radiations, on distingue :

- Les appareils à sélecteur de radiations, à variation continue : ils ont une source de radiations à spectre continu, couplée à un sélecteur de radiations à variation continue. Ils permettent de sélectionner n'importe quelle longueur d'onde.
- Les appareils à sélecteur de radiations, à variation discontinue :
  - appareils à spectres de raies : spectre discontinu à cause de la source de radiations ;
  - appareils à filtres : spectre discontinu à cause du sélecteur de radiations.

En fonction de la méthode de mesurage, on distingue :

• Les appareils à double faisceau : le résultat est obtenu par la comparaison simultanée d'un faisceau de mesure et d'un faisceau de référence : deux cuves optiques sont traversées simultanément.
En milieu professionnel, ils sont plus utilisés que les appareils à simple faisceau.

• Les appareils à simple faisceau : le résultat est obtenu à partir des mesures successives du faisceau de référence et du faisceau de mesure.

1.2. Analyse des qualités des spectrophotomètres

1.2.1. Justesse ou exactitude de l'appareil

C'est la qualité qui exprime l'aptitude d'un appareil à donner des valeurs égales à la valeur « vraie » théorique (T) de la grandeur mesurée (résultats d'absorbance, de % de transmission ou de concentrations).

Ainsi, la justesse traduit l'aptitude d'un appareil à donner des valeurs qui ne soient pas entachées d'erreurs systématiques.

La justesse (ou l'exactitude) de l'appareil dépend de la pureté spectrale du faisceau de radiations et de la linéarité de la réponse de la chaîne de mesurage.

Pour les spectrophotomètres munis d'un monochromateur à variation continue, la largeur de la bande passante est fonction essentiellement :

- Si le sélecteur de radiations est un réseau :
  - de la qualité du réseau (nombre de traits, par mm, plan ou concave...) et de la distance focale du monochromateur. Ces paramètres sont constants pour un spectrophotomètre donné ;
  - de la largeur des fentes d'entrée et de sortie du monochromateur. Plus les fentes sont fermées, plus étroite est la bande passante, mais aussi, moins la cellule reçoit de lumière.

- Si le sélecteur de radiations est un prisme :
  - de la qualité du prisme : angle au sommet, matière, type de montage ;
  - de la longueur d'onde : les prismes étalent plus largement les courtes longueurs d'onde que les longues ;
  - de la largeur des fentes : pour une ouverture des fentes constante, la largeur de la bande passante s'élargit au fur et à mesure que les longueurs d'onde augmentent.

La justesse d'un appareil peut être déterminée au moyen de solutions étalons dont les absorbances à des longueurs définies sont connues avec précision, par exemple : solutions de sulfate de cuivre, de sulfate ou de nitrate de cobalt, de nitrate de nickel, de bichromate de potassium, de paranitrophénol = substances dont les bandes d'absorption, dans le visible, ne sont pas trop étroites, afin que les largeurs des fentes associées au dispositif optique ne soient pas un facteur influençant le résultat.
Les substances choisies doivent être pures, stables et non fluorescentes.

La justesse (ou l'exactitude) d'un appareil est caractérisée par l'erreur de justesse (E) : écart entre la moyenne arithmétique (m) des valeurs données par l'appareil au cours de mesures répétées d'une même grandeur et la valeur « vraie » théorique (T) de la grandeur mesurée.

La détermination de l'erreur de justesse implique d'effectuer un grand nombre de fois le mesurage dans les mêmes conditions opératoires.

1.2.2. Fidélité de l'appareil

C'est la qualité qui exprime l'aptitude d'un appareil à donner, pour une même valeur de la grandeur mesurée, des valeurs concordant entre elles.

Ainsi, la fidélité exprime l'aptitude d'un appareil, à donner des indications qui ne soient pas faussées par des erreurs fortuites (dites « erreurs aléatoires » ou « erreurs accidentelles ») ou par des phénomènes de dérive.

L'erreur de fidélité est exprimée par la répétabilité des mesurages : dans un laps de temps assez court, pour une même valeur de la grandeur mesurée, on effectue une série de mesurages, sur le même échantillon, dans la même cuve.

L'erreur de fidélité traduit la distribution des valeurs mesurées autour de la moyenne arithmétique (m) d'une série de mesurages.

1.2.3. Précision de l'appareil

C'est la qualité qui exprime l'aptitude d'un appareil à donner des valeurs proches de la valeur « vraie » théorique (T) de la grandeur mesurée.

Elle est caractérisée par l'erreur de précision (= erreur globale ou totale, due à l'erreur de justesse + l'erreur de fidélité) qui affecte les résultats dans les conditions normales d'emploi de l'appareil. La précision varie en fonction de la longueur d'onde, de l'absorbance ou du pourcentage de transmission, ou de la largeur de la bande passante (cf. § 1.2.1.).

1.3. Analyse des qualités des systèmes optiques

1.3.1. Justesse de l'affichage en longueur d'onde

C'est la qualité qui correspond à l'aptitude d'un appareil à délivrer des radiations de longueur d'onde égale à la valeur affichée.
Elle est caractérisée par l'erreur de justesse : E.

La justesse de l'affichage en longueur d'onde peut être vérifiée par l'absorption de solutions aqueuses de nitrate ou de perchlorate d'holmium, par exemple.

1.3.2. Fidélité de l'affichage en longueur d'onde

C'est la qualité qui correspond à l'aptitude d'un appareil à donner, pour une même valeur d'affichage de longueur d'onde, des longueurs d'onde concordant entre elles.

REMARQUE : en biologie, la notion de précision n'est pas caractérisée comme en chimie ou en physique par l'erreur totale (normes AFNOR) mais par l'erreur aléatoire : elle traduit l'aptitude d'une technique de dosage à donner, pour une même grandeur mesurée, des résultats qui concordent entre eux et correspond ainsi à la qualité de fidélité.

Contrôle de la linéarité et de l'exactitude des absorbances d'un spectrophotomètre

1. PRINCIPE

On propose de contrôler la linéarité et l'exactitude des absorbances, au moyen de solutions étalons de paranitrophénol (pNP : Masse molaire = 139,11 $g.mol^{-1}$).

Ces solutions présentent un pic d'absorption assez large vers 405 nm et l'absorption suit la loi de Beer–Lambert dans le domaine d'absorbance testé : $0 \leq A \leq 2,4$.

Dans les conditions opératoires choisies : solutions de paranitrophénol en milieu tampon diéthanolamine–HCl 0,1 $mol.dm^{-3}$, pH 9,5, le coefficient spécifique d'absorbance molaire, à 405 nm, est : $\varepsilon = 1,8.10^3$ $m^2.mol^{-1}$.

2. RÉACTIFS

• *Solution étalon de paranitrophénol* à 139 mg par dm^3 en milieu tampon diéthanolamine – HCl 0,1 $mol.dm^{-3}$, pH 9,5.

• *Tampon diéthanolamine* – HCl 0,1 $mol.dm^{-3}$, pH 9,5
– HCl à 0,1 $mol.dm^{-3}$: 193,5 cm^3 ;
– diéthanolamine à 0,1 $mol.dm^{-3}$: 806,5 cm^3.

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Manipulation

A partir d'une solution étalon de paranitrophénol à 139 mg par dm^3, réaliser les solutions étalons suivantes, en milieu tampon pH 9,5 :

[pNP] $mol.dm^{-3}$	10^{-6}	5.10^{-6}	10^{-5}	2.10^{-5}	4.10^{-5}	6.10^{-5}	10^{-4}	$1{,}2.10^{-4}$

Effectuer les mesures d'absorbance à 405 nm.

3.2. Questions

1) Donner sous forme de tableau :
– la réalisation de la gamme de concentration en pNP et les calculs justificatifs ;
– les absorbances théoriques calculées ;
– les absorbances mesurées.

2) Tracer sur une feuille de papier millimétré, les courbes :
– $A_{mesurées} = f([pNP])$
– $A_{calculées} = f([pNP])$.

3) Déterminer graphiquement le coefficient spécifique d'absorbance molaire et calculer l'erreur d'exactitude et le degré d'inexactitude :

– erreur d'exactitude : $\Delta \varepsilon = [\ \varepsilon_{théorique} - \varepsilon_{expérimental}\ ]$

– degré d'inexactitude : $\dfrac{\Delta \varepsilon}{\varepsilon_{théorique}} \times 100$

4) Donner une conclusion sur la qualité – linéarité et exactitude – des absorbances données par le spectrophotomètre soumis au contrôle.

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. Tableau de réalisation des solutions étalons *(tabl. 9.I.)*

Solution étalon de paranitrophénol à 139 mg par dm^3, soit 10^{-3} $mol.dm^{-3}$.

Calcul des absorbances théoriques : $A = \varepsilon \times C \times l = 18\,000\,[pNP]_{\text{étalons}}$ (trajet optique de 1 cm).

Tableau 9.I.

[pNP] $mol.dm^{-3}$ à préparer	10^{-6}	5.10^{-6}	10^{-5}	2.10^{-5}	4.10^{-5}	6.10^{-5}	10^{-4}	$1,2.10^{-4}$
Coefficient de dilution	$\frac{1}{10^3}$	$\frac{5}{10^3}$	$\frac{1}{10^2}$	$\frac{2}{10^2}$	$\frac{4}{10^2}$	$\frac{6}{10^2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1,2}{10}$
A théorique à λ = 405 nm	0,018	0,090	0,180	0,360	0,720	1,080	1,800	2,160

4.2. Tracés graphiques

Attention au choix des échelles en abscisses *(fig. 9.3.)*.

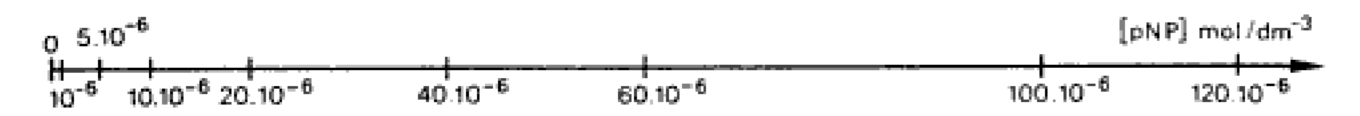


Fig. 9.3. Echelle des abscisses des courbes A = f [pNP]

4.3. Défaut de linéarité

Un défaut de linéarité pourra être imputé à l'appareil, si plusieurs séries de résultats le confirment, ou au manque de précision du manipulateur (0 % ≤ degré d'inexactitude ≤ 3 % au cours d'une séance de travaux pratiques).

Contrôle des qualités d'un spectrophotomètre

1. PRINCIPE

1.1. Contrôle de la qualité des systèmes optiques

1.1.1. Contrôle de la précision d'affichage des longueurs d'onde et du monochromatisme

Il s'agit de comparer les longueurs d'onde des maximums d'absorption et les valeurs des absorbances correspondantes, affichées par le spectrophotomètre à contrôler, avec les valeurs théoriques caractérisant un étalon.

Le domaine spectral doit couvrir les principales longueurs d'onde utilisées dans les domaines U V et visible.

Le nitrate ou le perchlorate d'holmium en solutions aqueuses présentent des bandes très étroites d'absorption dont les longueurs d'onde sont nettement définies entre 350 et 650 nm, longueurs d'onde très utilisées en biochimie *(tabl. 9.II. et fig. 9.4.).*

Ces sels sont utilisés, à la concentration de 50 $g.dm^{-3}$, comme solutions de contrôle de l'affichage des longueurs d'onde et du monochromatisme.

Tableau 9.II. : Longueurs d'onde (en nm) correspondant aux principaux pics d'absorption

Perchlorate d'holmium	*Nitrate d'holmium*
345,0	345
360,9	361
415,0	416
420,0	451
449,5	473
450,0	485
466,0	537
483,0	641
634,0	
636,0	
648,0	
652,0	

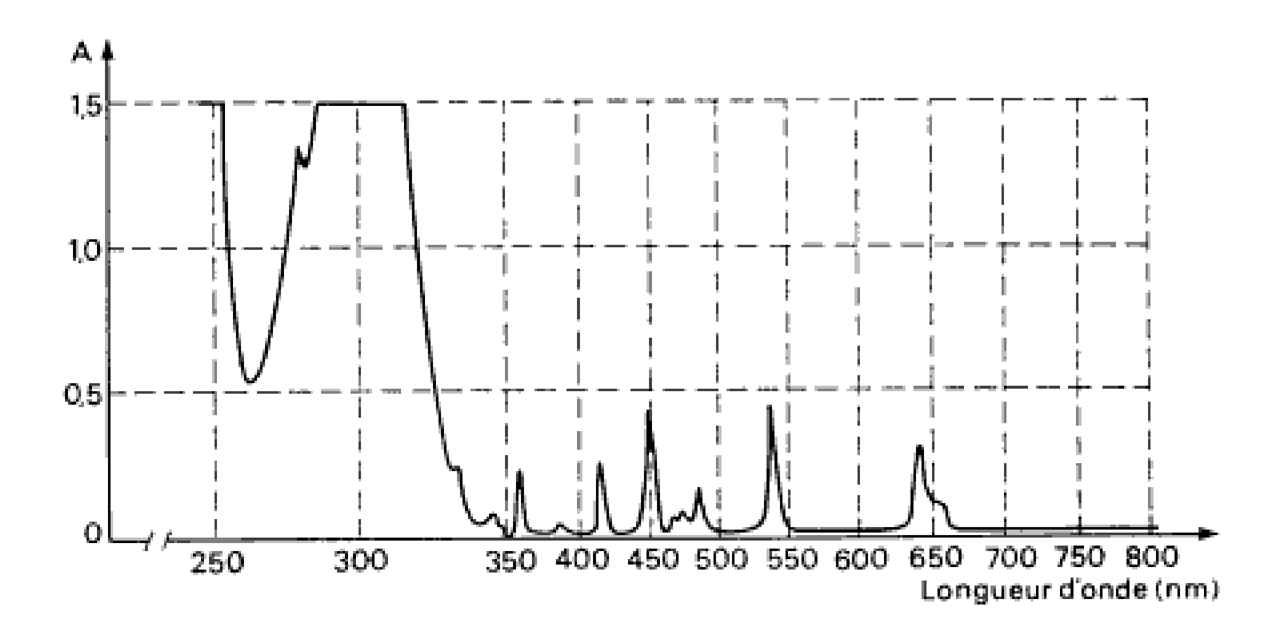


Fig. 9.4. Spectre d'absorption du nitrate d'holmium

Pour chacun des pics du spectre, les absorbances mesurées sont fonction de la qualité du monochromateur : plus les absorbances sont élevées, meilleure est la qualité du monochromateur (V. « justesse ou exactitude de l'appareil »).

L'ouverture des fentes diminue considérablement la sensibilité apparente de l'appareil.

1.2. Exactitude et linéarité des absorbances

La loi de Beer–Lambert établit la relation affine qui existe entre l'absorbance A et la concentration molaire d'une solution C : A = ε x l x C.

Le coefficient d'extinction molaire ε n'est constant que pour des solutions très diluées, c'est-à-dire pratiquement C ≤ 0,01 mol dm^{-3}.

$$\text{D'où : } \varepsilon_{limite} = \frac{A_{max}}{l \times C} = 300\ dm^{3} \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$$

pour : l = 1 cm de trajet optique
$A_{max} = 3$
C = 10^{-2} mol.dm^{-3}
et, pour C < 10^{-2} mol. dm^{-3} : ε > 300 dm^3 · mol^{-1} · cm^{-1} ou 30 m^2 · mol^{-1}.

On utilisera donc des solutions étalons dont le coefficient spécifique d'absorbance molaire ε à la longueur d'onde testée est suffisamment élevé pour que la fonction d'étalonnage soit définie pour A variant de 0 à 3.

1.2.1. Exemples

Pour le proche UV (334–340 nm)

• *Utilisation du NADH, H$^+$* : les solutions étalons sont préparées par pesées de sel disodique (masse molaire 709,5 g.mol^{-1}) en tampon Tris 80 mmol.dm^{-3} *(tabl. 9.III.)*.

Tableau 9.III.

NADH, H$^+$	*Absorbances théoriques à :*		
en µmol.dm^{-3}	*λ = 334 nm* *ε = 618 m^2 mol^{-1}*	*λ = 340 nm* *ε = 630 m^2 mol^{-1}*	*λ = 365 nm* *ε = 340 m^2 mol^{-1}*
63,5	0,392	0,400	0,216
127	0,785	0,800	0,432
190,5	1,177	1,200	0,648
254	1,570	1,600	0,864
317	1,959	1,997	1,078
348,7	2,155	2,197	1,186

Il est possible d'utiliser le « Kit commercial : UV-Trol-Biomérieux (réf. 6.231.1.).

• *Utilisation du bichromate de potassium :* les solutions étalons sont préparées à partir d'une solution étalonnée à 250 mg.dm^{-3} dans de l'acide sulfurique à 5.10^{-3} mol.dm^{-3} *(tabl. 9.IV.)*.

Tableau 9.IV.

Bichromate de K en mg.dm^{-3}	*Absorbances théoriques approximatives à :*			
	λ = 334 nm	*λ = 340 nm*	*λ = 350 nm*	*λ = 365 nm*
50	0,44	0,48	0,52	0,43
100	0,88	0,98	1,05	0,88
150	1,31	1,48	1,57	1,32
200	1,75	1,96	2,10	1,76
250	2,19	2,46	2,60	2,20

A 405 nm

• *Utilisation du paranitrophénol :* les solutions étalons sont préparées à partir d'une solution à 50 mg.dm^{-3} dans de la soude à 0,02 mol.dm^{-3} *(tabl. 9.V.).*

Tableau 9.V.

Solution à 50 mg.dm^{-3} (cm^3)	*NaOH à 0,02 mol.dm^{-3} q s p 50 cm^3 (cm^3)*	*Absorbances approximatives à λ = 405 nm*
5,0	45,0	0,50
10,0	40,0	1,00
15,0	35,0	1,50
20,0	30,0	2,00
25,0	25,0	2,50
30,0	20,0	3,00

Il est possible d'utiliser le « kit » commercial : Préciset P. Boehringer (réf. 293.455).

• *Utilisation du nitrate de nickel :* préparer par pesée de produit pur pour analyses une solution à 0,57 mol.dm^{-3} de nitrate de nickel dans de l'acide nitrique à 0,1 mol.dm^{-3}. Réaliser les dilutions indiquées dans le *tableau 9.VI.*

Tableau 9.VI.

Solution à 0,57 mol.dm^{-3} (cm^3)	*HNO_3 à 0,1 mol.dm^{-3} (cm^3)*	*Absorbances approximatives à λ = 405 nm*
1	19	0,12
2	18	0,25
4	16	0,50
8	12	1,00
12	8	1,00
16	4	2,00
20	0	2,50

De 250 à 750 nm

Il est possible d'utiliser le coffet Holnicob-Biotrol.

Le contrôle de la linéarité et de la justesse des absorbances mesurées est réalisé en utilisant :
- des solutions de nitrate de nickel en milieu acide : pH 1 ;
- des solutions de nitrate de cobalt en milieu acide : pH 1.

IMPORTANT : pour le réglage du zéro du spectrophotomètre, il faut utiliser le solvant de chacune des solutions étalons.

1.3. Stabilité des absorbances

Il s'agit de mesurer l'absorbance toutes les 30 secondes pendant 20 minutes, pour éventuellement mettre en évidence un délai de stabilisation, une instabilité ou une dérive.

Ce test peut être effectué à plusieurs niveaux d'absorbance, par exemple autour de zéro (eau distillée) puis vers une absorbance de 2 et ceci aux longueurs d'onde de travail les plus utilisées au laboratoire (340 nm avec le dichromate de potassium ; 405 nm avec le pNP).

2. RÉACTIFS

• *Sels d'holmium :* solution aqueuse de perchlorate d'holmium ou de nitrate d'holmium à 50 $g.dm^{-3}$ (on peut utiliser les coffrets de contrôle qui contiennent ce réactif en ampoules scellées).

• *Solution de paranitrophénol* à 10 $mg.dm^{-3}$:
- paranitrophénol : 10 mg ;
- solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 $mol.dm^{-3}$ q s p : 1 000 cm^3.

Cette solution présente un pic d'absorption assez large vers 405 nm pour une absorbance maximale de 1,2. Elle peut être utilisée pour le contrôle de la ligne de base.

• *Coffret Holnicob-Biotrol*

• *Produits chimiques et solutions cités précédemment.*

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Contrôle de la qualité des systèmes optiques

3.1.1. Contrôle de la précision d'affichage des longueurs d'onde et du monochromatisme

Réalisation des essais

Faire 10 fois le contrôle d'un spectrophotomètre (par exemple 10 étudiants contrôlent un même spectrophotomètre).

a) Contrôle d'un spectrophotomètre à double faisceau muni d'un enregistreur et d'un défilement automatique des longueurs d'onde

• *Contrôle de la ligne de base*

Ce contrôle a pour objectif de vérifier l'absence de variations de transmission optique des deux faisceaux.

Il consiste à enregistrer la « ligne de base » correspondant à une absorbance nulle (A = 0,000), ou à une transmission de 100 %, en faisant défiler en continu les longueurs d'onde, dans les conditions opératoires suivantes :
– sans introduire de cuves dans l'appareil ;
– en introduisant deux cuves appariées, propres et remplies d'eau distillée (l'une dans le faisceau de référence, l'autre dans le faisceau de mesure) ;
– en introduisant deux cuves appariées, propres et remplies de la même solution dont l'absorbance maximale ne dépasse pas A = 1,200 (par exemple une solution alcaline de paranitrophénol à 10 $mg.dm^{-3}$).

(Choisir deux cuves en quartz ou en silice si l'appareil est prévu pour l'UV).

Dans chacun des cas, régler le zéro en bout de l'échelle des longueurs d'onde.

Faire défiler les longueurs d'onde.

Vérifier que la « ligne de base » soit parfaitement rectiligne dans les trois cas.
La présence d'anomalies signifie que l'appareil est déréglé. Vérifier que les cuves ne soient pas en cause (souillées ou rayées) : anomalies dans les 2 derniers tests. Noter les variations de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde λ.

• *Enregistrement du spectre d'absorption du nitrate d'holmium*

Remplacer l'eau distillée de la cuve de mesure par la solution de nitrate d'holmium.

Faire défiler les longueurs d'onde à vitesse modérée (défilement des longueurs d'onde à 120 nm/min, déroulement du papier 60 mm/min ; soit finalement un défilement des longueurs d'onde à 2 nm/mm).

Déterminer avec précision les longueurs d'onde des maximums d'absorption et les absorbances correspondantes.

Compléter le tableau de résultats *(tabl. 9.VII.)*.

Tableau 9.VII.

Longueurs d'onde des principaux pics d'absorption (nm)	*Longeurs d'onde déterminées (nm)*	*Absorbances proposées*	*Absorbances lues*
641		0,37	
536		0,52	
485		0,18	
473		0,08	
451		0,48	
416		0,27	
361		0,22	
345		0,06	

Comparer les résultats obtenus aux valeurs proposées comme références.

b) Contrôle d'un spectrophotomètre à simple faisceau

Préparer deux cuves appariées, propres et remplies, l'une avec la solution de nitrate d'holmium, l'autre avec de l'eau distillée.

Mesurer les absorbances :
– pour les longueurs d'onde correspondant au maximum d'absorption théorique de chaque pic, proposées dans le *tableau 9.VIII.* ;
– puis, pour les longueurs d'onde voisines (jusqu'à ± 5 nm) de ces longueurs d'onde.

IMPORTANT : pour chaque longueur d'onde affichée sur l'appareil, il faut régler le zéro d'absorbance sur la cuve qui contient l'eau distillée.

Compléter le tableau de résultats.

Tableau 9.VIII.

Valeurs de référence		*Mesures*		
Longueurs d'onde des principaux pics d'absorption (nm)	*Absorbances proposées*	*Longueurs d'onde affichées* / *Absorbances lues*	*λ des pics d'absorption*	*A lue*
641	0,37			
536	0,52			
485	0,18			
473	0,08			
451	0,48			
416	0,27			
361	0,22			
345	0,06			

Comparer les résultats obtenus aux valeurs proposées comme références.

Résultats

1) Comparer les résultats obtenus aux valeurs retenues comme référence.

2) Justesse de l'affichage : pour une longueur d'onde donnée, calculer l'erreur de justesse (E) : écart entre la moyenne arithmétique (m) des 10 valeurs obtenues par les manipulateurs d'un même appareil et la valeur conventionnellement vraie (T).
Les longueurs d'onde déterminées ne doivent pas différer de plus de ± 1 nm de celles proposées.
Les absorbances ne doivent pas différer de plus de $\pm 1.10^{-2}$.

3) Fidélité de l'affichage : pour une longueur d'onde donnée, calculer l'erreur de fidélité : écart-type (σ) calculé à partir des 10 valeurs obtenues.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma\,(x_i - m)^2}{N - 1}}$$

N : nombre de valeurs obtenues < 30

3.1.2. Estimation de la largeur de la bande passante

Pour les spectrophotomètres à réseau, opérer à deux longueurs d'onde différentes : une dans l'UV, l'autre dans le visible (la largeur de la bande passante est constante en fonction de λ).

Pour les spectrophotomètres à prismes et à filtres interférentiels continus dont la largeur de la bande passante varie en fonction de λ, opérer à toutes les longueurs d'onde des pics d'absorption.

Pour chaque pic d'absorption, déterminer l'intervalle de longueurs d'onde dans lequel l'absorbance est égale à la moitié de l'absorbance maximale : exprimé en nm, cet intervalle est pour une ouverture de fente donnée une estimation de la largeur de la bande passante.

3.2. Contrôle des mesures d'absorbance

Les contrôles de la linéarité et de l'exactitude des absorbances données par un spectrophotomètre peuvent être réalisés avec des solutions étalons de nitrate de nickel et de nitrate de cobalt.

Les solutions étalons de nitrate de nickel en solution acide nitrique à 0,1 mol.dm^{-3} (pH 1) ont pour concentrations molaires : 0,1 mol.dm^{-3}, 0,2 mol.dm^{-3} et 0,3 mol.dm^{-3}.

Les solutions de nitrate de cobalt en solution acide nitrique à 0,1 mol.dm^{-3} (pH 1) ont pour concentrations molaires : 0,025 mol.dm^{-3}, 0,05 mol.dm^{-3}, 0,1 mol.dm^{-3} et 0,2 mol.dm^{-3}.

3.2.1. Réalisation des essais

Préparer deux cuves appariées, propres (en quartz ou en silice, si l'appareil peut fonctionner en UV).

Remplir l'une des cuves avec une des solutions étalons de nitrate de nickel ou de nitrate de cobalt et l'autre cuve avec le solvant de préparation des solutions étalons : solution acide nitrique à 0,1 mol.dm^{-3} (réglage du zéro du spectrophotomètre).

• *Contrôle d'un spectrophotomètre à double faisceau muni d'un enregistreur et d'un défilement automatique des longueurs*

Enregistrer le spectre d'absorption de chacune des solutions étalons.

Compléter les *tableaux 9.IX. et 9.X.*

Tableau 9.IX. : Solutions de nickel

			Solutions étalons à					
			0,1 mol.dm^{-3}		*0,2 mol.dm^{-3}*		*0,4 mol.dm^{-3}*	
	λ théoriques	*λ déterminées*	*A théoriques*	*A lues*	*A théoriques*	*A lues*	*A théoriques*	*A lues*
1° maximum	720		0,22		0,43		0,87	
2° maximum	655		0,19		0,38		0,76	
3° maximum	394		0,51		1,02		2,00	
1° minimum	345		0,04		0,09		0,19	
4° maximum	301		1,40		> 2		> 2	
2° minimum	263		0,32		0,65		1,40	

Tableau 9.X. : Solutions de cobalt

	λ théoriques	λ déterminées	0,025 mol.dm^{-3} A théoriques	0,025 mol.dm^{-3} A lues	0,05 mol.dm^{-3} A théoriques	0,05 mol.dm^{-3} A lues	0,1 mol.dm^{-3} A théoriques	0,1 mol.dm^{-3} A lues	0,2 mol.dm^{-3} A théoriques	0,2 mol.dm^{-3} A lues
1° maxi.	511		0,12		0,24		0,49		0,98	
2° maxi.	302		0,35		0,70		1,39		> 2	
mini.	263		0,08		0,17		0,37		0,83	

(Colonnes A : *Solutions étalons à* 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,2 mol.dm^{-3})

- *Contrôle d'un spectrophotomètre à simple faisceau*

Mesurer les absorbances :
– pour les longueurs d'onde correspondant aux maximums ou aux minimums d'absorption théoriques proposées dans le *tableau 9.XI.* ;
– puis, pour les longueurs d'onde voisines (jusqu'à ± 5 nm) de ces longueurs d'onde.

Déterminer avec précision les longueurs d'onde qui correspondent aux pics d'absorption.

IMPORTANT : pour chaque longueur d'onde affichée sur l'appareil, il faut régler le zéro d'absorbance sur la cuve qui contient la solution acide pH 1.

Compléter pour chaque solution étalon un tableau de résultats (comme *tabl. 9.XI.*).

Tableau 9.XI.

Valeurs de référence		*Solutions de nickel à 0,1 mol.dm^{-3}*	*Valeurs du spectrophotomètre*	
Longueurs d'onde théoriques	*Absorbances théoriques*	*Longeurs d'onde affichées Absorbantes lues*	*λ retenues*	*A retenues*
720	0,22			
655	0,19			
394	0,51			
345	0,04			
301	1,40			
263	0,32			

3.2.2. Résultats

Comparer les résultats obtenus aux valeurs retenues comme référence.

Les valeurs mesurées par l'appareil ne doivent pas différer de plus de ± 1 nm pour les longueurs d'onde, et de plus de ± 1.10^{-2} pour les absorbances.

3.3. Contrôle de la stabilité des absorbances

3.3.1. Réalisation des essais

Stabilité du spectrophotomètre à 340 nm :

Préparer trois cuves appariées :
- une remplie d'une solution acide de bichromate de K à 50 $mg.dm^{-3}$;
- une remplie d'une solution acide de bichromate de K à 200 $mg.dm^{-3}$;
- une remplie d'acide sulfurique à 5.10^{-3} $mol.dm^{-3}$ (zéro du spectrophotomètre).

Stabilité du spectrophotomètre à 405 nm :

Préparer trois cuves appariées :
- une remplie d'une solution basique de pNP à 5 $mg.dm^{-3}$;
- une remplie d'une solution basique de pNP à 30 $mg.dm^{-3}$;
- une remplie d'une solution de soude à 0,02 $mol.dm^{-3}$.

Mesurer les absorbances toutes les 30 secondes pendant 20 min.

3.3.2. Résultats

Le temps de stabilisation est égal au temps écoulé entre la mise sous tension de l'appareil et la première mesure d'une série de valeurs constantes.
Dresser un tableau des absorbances affichées par le spectrophotomètre en fonction du temps.
Conclure éventuellement sur la présence d'une instabilité ou d'une dérive, pour une longueur d'onde donnée.

EXERCICES

Mise au point d'un protocole opératoire pour contrôler la linéarité et l'exactitude des absorbances d'un spectrophotomètre

Préparer une gamme de solutions étalons de permanganate de potassium (masse molaire : 158,03 $g.mol^{-1}$; le coefficient spécifique d'absorbance molaire ε_{KMnO4} à 540 nm à 19-20 °C = 2 160 $dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$) afin de vérifier la linéarité et l'exactitude d'un spectrophotomètre.

On dispose d'une solution de $KMnO_4$ de concentration massique voisine de 3 $g.dm^{-3}$.
Réaliser une gamme de solutions étalons couvrant le domaine d'absorbance de $0 \leq A \leq 2,4$.

1) Etalonnage de la solution de $KMnO_4$ = 3 g.dm^{-3} :

- *soit par pesées d'acide oxalique pur pour analyses* ($\begin{array}{l}COOH\\|\\COOH\end{array}$, $2H_2O$; masse molaire : 126 g.mol^{-1})

$$(X2)\quad MnO_4^- + 8\,H^+ + 5e^- \longrightarrow Mn^{2+} + 4\,H_2O$$

$$(X5)\quad \begin{array}{l}COOH\\|\\COOH\end{array} \longrightarrow 2\,CO_2 + 2\,H^+ + 2e^-$$

$$\text{bilan :}\quad 2\,MnO_4^- + 16\,H^+ + 5\begin{array}{l}COOH\\|\\COOH\end{array} \longrightarrow 10\,CO_2 + 2\,Mn^{2+} + 8\,H_2O + 10\,H^+$$

$$n_{MnO_4^-} = 2/5\; n_{(COOH)2}$$

$$C_{MnO_4^-} \times V_{MnO_4^-} = 2/5\; \frac{m\,(COOH)2}{M\,(COOH)2}$$

$m_{(COOH)2} = 5/2 \times (C_{MnO_4^-} \times V_{MnO_4^-}) \times M_{(COOH)\,2} \approx 5/2 \times 3/158 \times 20 \times 10^{-3} \times 126$

d'où $0{,}100\text{ g} \leq m_{(COOH)\,2} \leq 0{,}120$ g.

- *soit par pesées d'oxalate de sodium pur pour analyses* ($\begin{array}{l}COO^-\,Na^+\\|\\COO^-\,Na^+\end{array}$; masse molaire : 134 g.mol^{-1})

$$(X2)\quad MnO_4^- + 8\,H^+ + 5e^- \longrightarrow Mn^{2+} + 4\,H_2O$$

$$(X5)\quad \begin{array}{l}COO^-\\|\\COO^-\end{array} \longrightarrow 2\,CO_2 + 2e^-$$

$$\text{bilan :}\quad 2\,MnO_4^- + 16\,H^+ + 5\begin{array}{l}COO^-\\|\\COO^-\end{array} \longrightarrow 10\,CO_2 + 2\,Mn^{2+} + 8\,H_2O$$

$$n_{MnO_4^-} = 2/5\; n_{(COONa)2}$$

$$C_{MnO_4^-} \times V_{MnO_4^-} = 2/5\; \frac{m_{(COONa)\,2}}{M_{(COONa)\,2}}$$

$m_{(COOH)\,2} = 5/2 \times (C_{MnO_4^-} \times V_{MnO_4^-}) \times M_{(COONa)\,2} \approx 5/2 \times 3/158 \times 20 \times 10^{-3} \times 134$

d'où $0{,}100\text{ g} \leq m_{(COONa)\,2} \leq 0{,}127$ g.

- *soit par pesées de sel de Mohr pur pour analyses* [$FeSO_4$, $(NH_4)_2$, $6H_2O$] : masse molaire 392,16 g.mol^{-1}

$$MnO_4^- + 8\,H^+ + 5e^- \longrightarrow Mn^{2+} + 4\,H_2O$$

$$(X5)\quad Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + e^-$$

$$\text{bilan :}\quad MnO_4^- + 8\,H^+ + 5\,Fe^{2+} \longrightarrow Mn^{2+} + 5\,Fe^{3+} + 4\,H_2O$$

$$n_{MnO_4^-} = 1/5\; n_{Fe2+}$$

$$C_{MnO_4^-} \times V_{MnO_4^-} = 1/5 \ \frac{m_{FeSO4}}{M_{FeSO4}}$$

$m_{FeSO4} = 5 \times (C_{MnO_4^-} \times V_{MnO_4^-})\ M_{FeSO4} \approx 5 \times 3/158 \times 20 \cdot 10^{-3} \times 392{,}16$

d'où $0{,}600 \text{ g} \leq m_{FeSO4} \leq 0{,}740 \text{ g}$

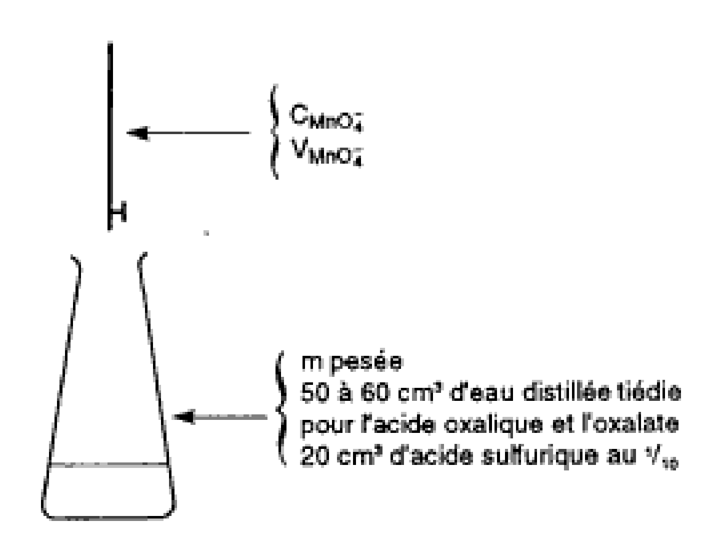


Fig. 9.5. Réalisation de l'étalonnage

2) Préparation des solutions étalons :

Solution initiale de $KMnO_4$ à ≈ 3/158 mol.dm^{-3}, soit ≈ 0,02 mol.dm^{-3}.

Il est possible de préparer les solutions étalons indiquées dans le *tableau 9.XII*.

Tableau 9.XII

Solutions étalons en mol.dm^{-3}	$0{,}1.10^{-4}$	$0{,}5.10^{-4}$	10^{-4}	2.10^{-4}	4.10^{-4}	6.10^{-4}	8.10^{-4}	10^{-3}
Dilution de la solution initiale	0,1/200	05/200	1/200	1/100	2/100	3/100	4/100	5/100
A théorique à λ = 540 nm	0,022	0,108	0,216	0,432	0,864	1,296	1,728	2,160



FLUORIMÉTRIE

SOMMAIRE

PAGE

Le but de la manipulation est de doser par fluorimétrie :
• soit un coenzyme : une solution de nicotinamide adénine dinucléotide réduite ;
• soit une vitamine : la thiamine ou vitamine B_1 après extraction d'un produit alimentaire.

1. PRINCIPE

1.1. Fluorescence atomique, fluorescence moléculaire

Quand un rayonnement lumineux traverse une substance minérale ou organique en solution, l'énergie de la lumière incidente est absorbée si celle-ci correspond à la différence d'énergie entre deux niveaux électroniques ou états d'énergie définis par la mécanique quantique (cf. chapitre 8).

L'énergie absorbée par une molécule fait passer un électron de son niveau fondamental à un niveau énergétique supérieur, instable ou niveau « excité ».

La molécule excitée perd cette énergie quand l'électron revient à son état fondamental, stable. Le plus souvent, l'énergie se dissipe sous forme de chaleur, très rapidement, en moins de 10^{-12} seconde.

Pour certaines structures moléculaires très rigides, la perte d'énergie peut être lente. La molécule est alors capable d'émettre à son tour un photon lors du retour à l'état fondamental. C'est la *photoluminescence* qui peut être mesurée par spectrophotométrie d'émission. On distingue la *fluorescence* et la *phosphorescence*. La fluorescence se produit quelques nanosecondes après l'excitation lumineuse ; la phosphorescence apparaît plus tardivement et dure plus longtemps.

La fluorescence a actuellement plus d'applications au laboratoire que la phosphorescence.

1.2. Le spectrofluorimètre *(fig. 10.1.)*

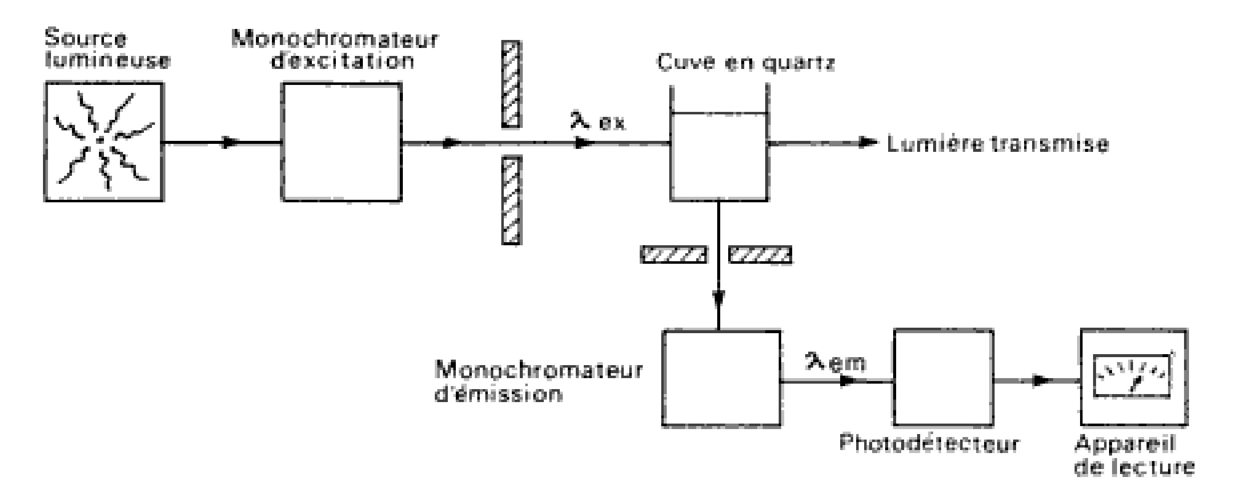


Fig. 10.1. Schéma de principe d'un spectrofluorimètre

1.2.1. La source lumineuse

Elle est le plus souvent constituée d'une lampe à arc au xénon, de grande énergie et qui fournit un spectre continu.

1.2.2. Les monochromateurs

La plupart des spectrofluorimètres sont à simple faisceau et sont munis de deux monochromateurs à réseaux, l'un pour l'excitation, l'autre pour l'émission.

1.2.3. Le détecteur

C'est un photomultiplicateur, généralement disposé orthogonalement par rapport au faisceau incident afin :
– que la lumière incidente n'atteigne pas le détecteur ;
– de limiter les lumières parasites de diffusion de Rayleigh (par des particules non absorbantes présentes dans le milieu) ou de Raman (due aux vibrations des molécules).

1.2.4. La cellule de mesure

C'est une cuve en quartz non fluorescent, à quatre faces optiques.

1.3. Application aux dosages

La fluorimétrie est une méthode analytique plus sensible que la spectrophotométrie. La limite supérieure de détection en fluorescence correspond à la limite inférieure en spectrophotométrie. Il est possible de détecter des quantités inférieures à la picomole de substance fluorescente.

Cette méthode analytique est donc utilisée pour doser des substances naturellement fluorescentes ou pouvant le devenir après couplage à des substances fluorescentes.

Les composés aromatiques sont généralement fluorescents : l'émission est d'autant plus importante que la molécule a une structure rigide, plane et peu encombrée. Ainsi, la fluorescence des formes réduites des nucléotides pyridiniques ou des formes oxydées des flavines permet de suivre une réaction d'oxydo-réduction enzymatique.

De même, la plupart des cations métalliques peuvent former des chélates fluorescents : ainsi, le dosage du calcium par fluorescence est basé sur l'emploi de colorants fluorescents tels que la calcéine ou le Fura-2 qui permet le dosage du calcium intracellulaire.

La solution est excitée à une longueur d'onde qui est en général celle de son maximum d'absorption. Une partie de l'énergie absorbée sous forme de photons va être perdue pendant « l'état excité », l'énergie d'émission sera donc plus faible : il en résulte que la longueur d'onde d'émission est toujours plus grande que celle du rayonnement reçu.

Le rendement quantique :

$$Q_Z = \frac{\text{photons émis}}{\text{photons absorbés}}$$

est inférieur à 1.

L'intensité de fluorescence (I_z) ne suit pas la loi de Beer-Lambert.

Mais pour des solutions diluées dont l'absorbance (A) est inférieure à 0,05, l'intensité de fluorescence correspond à l'équation :

$$I_z = k \times I_0 \times Q_z \times \varepsilon \times C \times l$$

avec :

k = constante de proportionnalité ;
I_0 = intensité incidente ;
Q_z = rendement quantique ;
ε = coefficient spécifique d'absorbance molaire ;
C = concentration de la solution ;
l = longueur du trajet optique.

Pour des solutions plus absorbantes, l'excitation des molécules baisse au fur et à mesure que le faisceau incident traverse la cellule de mesure : c'est le « quenching ».

2. DOSAGE D'UN COENZYME

2.1. Réactifs

• *NADH, H⁺* à peser (dihydronicotinamide adénine dinucléotide disodique : NADH, Na_2 $C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}P_2$. Masse molaire = 709,42 g.mol^{-1}).

• *Solution de NADH, H⁺ à doser.*

2.2. Fiche technique

2.2.1. Courbe d'étalonnage

– Préparer par pesée une solution aqueuse de NADH, H⁺ à 10^{-3} mol.dm^{-3}.

– A partir de la solution mère de NADH, H⁺, préparer la gamme de concentrations en NADH, H⁺ indiquée dans le *tableau 10.I.*

Tableau 10.I.

N° des tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
NADH, H⁺ (µl)	0	40	80	120	160	200	240
H_2O (cm³) q s p 4 cm³							
NADH, H⁺ µmol.dm^{-3}							

2.2.2. Mesure de la fluorescence

– Placer le monochromateur d'excitation sur 340 nm.

– Faire le spectre d'émission de la solution étalon de NADH, H⁺ la plus concentrée (n° 6), entre 400 et 500 nm, lorsque celle-ci est excitée à 340 nm.

– Placer le monochromateur de fluorescence sur le maximum d'émission déterminé précédemment.

– Mesurer l'émission des solutions étalons de NADH, H⁺ et de la solution à doser.

2.2.3. Questions

1) Compléter le tableau de préparation des solutions étalons.

2) Préciser la longueur d'onde d'émission maximale pour le NADH, H^+.

3) Tracer la courbe de l'émission en fonction de la concentration en NADH, H^+.

4) Déterminer la concentration de la solution à doser et calculer éventuellement le rendement du dosage si la valeur attendue est connue.

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Préparation des solutions étalons

Préparation de la solution mère de NADH, H^+ : m = C x M x U = 10^{-3} x 709,42 x 100.10^{-3} = 0,0709 g pour U = 100 cm^3 de solution aqueuse *(tabl. 10.II.)*.

Tableau 10.II.

N° des tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
H_2O (cm^3) q s p 4 cm^3	4	3,96	3,92	3,88	3,84	3,80	3,76
NADH, H^+ µmol.dm^{-3}	0	10	20	30	40	50	60

2.3.2. Rendement du dosage

$$\frac{\text{concentration déterminée}}{\text{concentration attendue}} \times 100$$

3. DOSAGE DE LA THIAMINE (VITAMINE B_1)

L'échantillon à analyser est soigneusement broyé, puis l'extraction de la vitamine B_1 hydrosoluble est réalisée en milieu acide.

Le thiochrome formé lors de l'oxydation de la thiamine par le chlorure mercurique est dosé par fluorimétrie.

Thiamine ou vitamine B_1 :

3.1. Réactifs

- *Acide chlorhydrique à 0,1 mol.dm^{-3}.*
- *Chlorure mercurique* ($HgCl_2$) à 0,5 mg.cm^{-3}.
- *Tampon phosphate* 0,2 mol.dm^{-3} pH12,2.
- *Solution étalon de thiamine* à 15 ppm préparée dans du HCl 0,1 mol.dm^{-3} : préparer une solution à 15.10^{-6} g.dm^{-3} soit 15 µg.dm^{-3}.
- *Produit alimentaire à doser* (céréales, farine...).
- *Chlorure de sodium* pur pour analyses.

3.2. Fiche technique

3.2.1. Extraction de la vitamine

Essai n° 1 : peser 5 g de produit à analyser (farine) et 5 g de NaCl. Transférer dans un mortier. Ajouter 80 cm^3 de HCl à 0,1 mol.dm^{-3}.

Essai n° 2 : peser 5 g de produit à analyser (farine) et 5 g de NaCl. Transférer dans un mortier. Ajouter 5 cm^3 de la solution mère de thiamine puis 75 cm^3 de HCl à 0,1 mol.dm^{-3}.

– Broyer avec soin les deux préparations précédentes de façon à obtenir une suspension homogène.

– Porter au bain-marie (100 °C) pendant 30 min. Agiter régulièrement avec une baguette de verre pour remettre le précipité en suspension.

– Refroidir et ajouter 20 cm^3 de HCl à 0,1 mol.dm^{-3}.

– Centrifuger une trentaine de minutes à 15 000 tours par minute. Les surnageants doivent être limpides. Décanter la solution dans un erlenmeyer propre et sec.

– A partir de chaque surnageant, préparer 5 cm^3 des dilutions suivantes en HCl à 0,1 mol.dm^{-3} : coefficients de dilution 1/d = 1/1 ; 1/2 ; 1/3 ; 1/4 ; 1/5.

3.2.2. Etalonnage de l'appareil

A partir de la solution étalon de thiamine à 15 ppm, préparer en HCl à 0,1 mol.dm $^{-3}$ des solutions de concentrations comprises entre 0 et 1,5 ppm.

3.2.3. Préparation des échantillons : oxydation de la thiamine

Pour chaque solution à doser, introduire dans un tube à essais :
- solution à doser (essais, solutions étalons) : 1 cm^3 ;
- solution de $HgCl_2$: 1 cm^3 ;
- tampon pH 12,2 : 1 cm^3.

Homogénéiser.
Laisser agir pendant 2 heures à la température du laboratoire.

3.2.4. Mesure de la fluorescence

- A l'aide de la solution étalon la plus concentrée :
  - déterminer la longueur d'onde d'excitation λex. et la longueur d'onde d'émission λém. de la thiamine oxydée ;
  - faire un spectre d'excitation (λém constante) ;
  - faire un spectre d'émission (λex. constante).

- Placer le monochromateur d'excitation sur λex. et mesurer l'émission des solutions étalons de thiamine.

- Faire les spectres d'excitation et d'émission de l'échantillon qui correspond à l'essai n° 1 non dilué.

- Mesurer l'émission des essais.

3.2.5. Questions

1) Donner sous forme de tableau la préparation des solutions étalons de thiamine.

2) Préciser les longueurs d'onde d'excitation λex et d'émission λém de la thiamine oxydée.

3) Tracer la courbe de l'émission en fonction de la concentration en thiamine.

4) Analyser les résultats obtenus pour les différentes dilutions réalisées sur les essais n° 1 et n° 2 et mettre éventuellement en évidence un phénomène « quenching ». Utiliser les dilutions des essais pour lesquelles ce facteur d'interférence n'apparaît pas.

5) Evaluer le rendement du dosage à partir de la différence des résultats obtenus pour les essais (apport et non apport de thiamine).

6) Déterminer à partir de la courbe d'étalonnage et du rendement du dosage, la teneur en thiamine du produit alimentaire analysé. Exprimer le résultat en ppm et en milligrammes de thiamine pour 100 grammes de produit analysé.
Comparer éventuellement avec la valeur annoncée par le fabriquant.

3.3. Mode opératoire

3.3.1. Tableau de préparation des solutions étalons (tabl. 10.III.)

Tableau 10.III.

N° des tubes	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*
Solution de thiamine à 15 ppm (cm^3)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
HCl à 0,1 $mol.dm^{-3}$ (cm^3)	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9
Concentrations en thiamine (ppm)	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	0,90	1,05	1,20	1,35	1,50

3.3.2. Calcul de la longueur d'onde

- La longueur d'onde d'excitation λex. : 360-365 nm.
- La longueur d'onde d'émission λém : 460-480 nm.

3.3.3. Calcul de la teneur en mg de thiamine dans 100 g de produit analysé

Soit X ppm de thiamine dans l'essai n° 1 dilué avec un coefficient 1/d.

La concentration en thiamine de la solution acide formée à partir de 5 g de farine est :

$$[\text{thiamine}] = d \cdot X \text{ ppm, soit } d \cdot X \cdot 10^{-6} \text{ g.dm}^{-3}$$

La teneur de la farine en mg de thiamine pour 100 g de produit analysé est :

$$[\text{thiamine}] = d \cdot X \cdot 10^{-3} \cdot 10^{-1} \cdot 100/5 = 2 \cdot 10^{-3} \cdot d \cdot X$$



4. EXERCICE

(extrait d'un sujet d'examen)

Etude d'un coenzyme : le nicotinamide adénine dinucléotide

NADH, H^+ est fluorescent lorsqu'il est excité par un rayonnement de 340 nm et cette fluorescence est plus élevée en présence de LDH. On réalise, d'une part, une solution de NADH, H^+ à 10^{-3} $mol.dm^{-3}$ dans un tampon pH 7,2 et d'autre part, une solution de LDH à une concentration de 0,473 $mg.dm^{-3}$ dans le même tampon.

A 2 cm³ de la solution de LDH, on ajoute des volumes définis de la solution de NADH, H^+. Après chaque addition, on mesure l'émission fluorescente à 460 nm. On réalise une expérience témoin lorsque les mêmes volumes de NADH, H^+ sont ajoutés à 2 cm³ de tampon.

Résultats obtenus *(tabl. 10.IV.)*

Tableau 10.IV.

Volume total de NADH (en µl)	*Fluorescence en présence de LDH (unités arbitraires)*	*Fluorescence en absence de LDH*
0	0	0
5	1,3	0,3
10	2,5	0,6
15	3,9	0,9
20	5,1	1,2
25	6,1	1,6
30	6,8	1,9
35	7,2	2,2
40	7,5	2,5
50	8,1	3,1
60	8,8	3,8
70	9,4	4,4
80	10,0	5,0

1) Tracer les courbes représentant les variations de la fluorescence en fonction du volume de NADH, H^+ ajouté. Interpréter ces courbes.

2) Sachant que la masse molaire de la LDH est égale à 150 000 $g.mol^{-1}$ et que la formation du complexe enzyme–NADH, H^+ peut être considérée comme une réaction pratiquement irréversible, déterminer le nombre de molécules de NADH, H^+ qui se fixent sur une molécule de LDH.

3) La LDH étant constituée de 4 sous-unités, que peut-on en conclure ?

Données : on négligera le volume de la solution de NADH, H^+ par rapport à celui de la solution de LDH.

CORRECTION DE L'EXERCICE

1) En présence de LDH : la fluorescence augmente fortement proportionnellement à la quantité de NADH, H^+ présente dans le milieu réactionnel, jusqu'à ce que la LDH soit saturée en coenzyme (co-substrat), puis la courbe a la même pente que celle obtenue sans LDH *(fig. 10.2.)*.

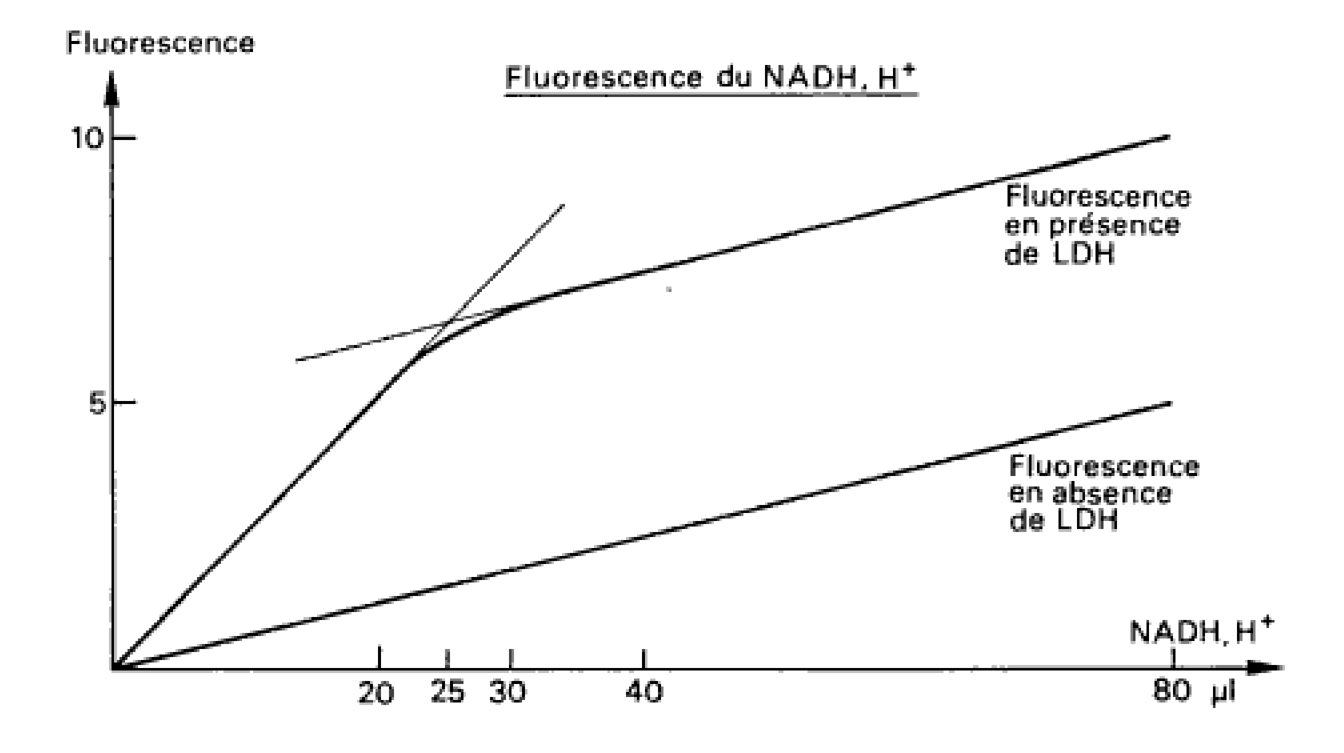


Fig. 10.2. Fluorescence du NADH, H^+

2)

$$\frac{0{,}473.10^{-3} \times 2}{150\,000} = 6{,}3\ 10^{-9}$$ mole d'enzyme sont saturées par ≈ 26 µl de NADH, H^+ à 10^{-3} mol.dm^{-3}, soit $26.10^{-6} \times 10^{-3} = 26.10^{-9}$ mole de NADH, H^+.

$n_{NADH,\,H^+} = 4 \times n_{LDH}$

3) Chaque sous-unité de la LDH porte un site pour la fixation du NADH, H^+.



DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES. MÉTHODE DU BIURET

SOMMAIRE

PAGE

Le but de la manipulation est de doser les protéines totales par une méthode chimique : la réaction du biuret.

Le dosage est basé sur la formation, en milieu alcalin, d'un complexe de coloration violet-pourpre entre des ions cuivriques et les liaisons peptidiques des protéines.

1. PRINCIPE

1.1. La réaction du biuret

Basée sur la présence de liaisons peptidiques, la réaction du biuret est couramment utilisée pour le dosage des protéines.

Le réactif de coloration utilisé est le réactif de Gornall, composé de :
– sulfate de cuivre (coloration bleue du réactif de Gornall due aux ions Cu^{2+}) ;
– hydroxyde de sodium ;
– tartrate double de sodium et de potassium qui chélate les ions Cu^{2+} et évite leur précipitation, en milieu très alcalin, sous forme d'hydroxyde de cuivre insoluble ;
– iodure de potassium pour éviter la réduction du cuivre.

Initialement mise en évidence avec le biuret $H_2N{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}NH{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}NH_2$ obtenu par condensation à chaud de deux molécules d'urée, la coloration nécessite pour se développer :
– soit la séquence –NH–CO–NH–CO–NH– présente dans la structure du biuret ;
– soit la séquence –CH–NH–CO–NH–CH– présente dans la structure des chaînes polypeptidiques.

La liaison C–N peptidique est stabilisée sous la forme d'un hybride de résonance dont les deux strutures limites sont :

—Cα–C(=O)–N(H)–Cα— ⇌ —Cα–C(–O^-)=N^+(H)–Cα—

(1) = 70 % (2) = 30 %

En (1) la liaison C–N peptidique est une liaison covalente simple.

En (2) il existe une double liaison entre le carbone et l'azote et, d'autre part, l'azote porte une charge positive tandis que l'oxygène porte une charge négative.

La liaison peptidique est un compromis entre ces deux hybrides de résonance et possède un caractère partiel de double liaison.

En milieu alcalin, l'équilibre est déplacé vers la forme (2).

En présence d'ions cuivriques, les liaisons peptidiques vont former des complexes stabilisés par des liaisons ioniques grâce à l'oxygène du carbonyle, et par des liaisons de coordination grâce à l'azote peptidique. D'où apparition d'une coloration violet pourpre.

Représentation schématique :

Il faut au minimum 3 (tétrapeptide) ou 4 (pentapeptide) liaisons peptidiques pour que le complexe se forme. L'intensité de la coloration sera fonction du nombre de liaisons peptidiques par gramme de protéine et non de la masse molaire de la protéine.

Le réactif de Gornall permet le dosage de protéines précipitées même si elles sont dénaturées : pour des concentrations supérieures à 0,5 $g.dm^{-3}$, on peut recueillir le précipité par centrifugation ou par décantation, le dissoudre dans de l'hydroxyde de sodium, puis doser les protéines.

La solution étalon est :
– soit une solution de sérumalbumine bovine ou humaine (holoprotéine) ;
– soit un sérum étalon pour le dosage des protéines totales du sérum (population mixte de protéines).

Le maximum d'absorption se situe entre 530–550 nm, il varie avec la nature de la protéine.

1.2. Limites de la méthode

La réaction du biuret est peu sensible : domaine de linéarité = 2 à 8 $g.dm^{-3}$. Elle ne permet pas le dosage de solutions peu concentrées en protéines.

La réaction du biuret n'est pas rigoureusement spécifique des protéines : divers produits de dégradation de celles-ci, des polypeptides et même des substances ne contenant pas de liaisons peptidiques peuvent interférer sur le dosage et donner une réaction colorée.

Les risques de réduction des ions cuivriques par les sucres réducteurs, en milieu alcalin, limitent l'utilisation de cette méthode, notamment en agro-alimentaire. Ainsi la réaction du biuret ne donne pas de résultats satisfaisants pour le dosage des protéines du lait (3,4 % en masse), à cause du lactose (3,6 % en masse), seules les teneurs en protéines des céréales et des légumineuses (8 à 36 % en masse) peuvent être déterminées par la méthde du biuret après élimination des autres constituants organiques : glucides (20 à 75 % en masse) et lipides (0,5 à 18 % en masse).

2. DOSAGE DES PROTÉINES DU BLANC D'ŒUF

La composition moyenne du blanc d'œuf (% en masse) est :
- eau : 85,0
- protéines : 12,9
- lipides : 0,3
- glucides : 0,8
- sels minéraux : 1,0

Le dosage est réalisé sur une dilution au 1/50 de blanc d'œuf de poule.

2.1. Réactifs

- *Réactif de Gornall (en distributeur)* :
- sulfate de cuivre, 5 H_2O : 1,50 g ;
- tartrate double de sodium et de potassium : 6 g ;
- soude : 30 g ;

– iodure de potassium : 1 g ;
– eau distillée : 1 000 cm^3.

Réactif à conserver à l'abri de la lumière, dans un flacon en polyéthylène soigneusement bouché.

- *Eau physiologique* à 9 g NaCl.dm^{-3}.

- *Oeuf de poule* ou dilution au 1/50 d'un blanc d'œuf en eau physiologique, 1 cm^3 de blanc d'œuf q s p 50 cm^3 avec de l'eau physiologique.

- *Solution étalon d'albumine* à 5 g.dm^{-3}.

2.2. Fiche technique

2.2.1. *Dosage*

Dans un tube à essais, introduire :
– E = 1 cm^3 de la dilution au 1/50 d'un blanc d'œuf ;
– 4 cm^3 de réactif de Gornall.

Attendre 30 minutes à l'obscurité, à température du laboratoire.

Mesurer l'absorbance à 530 nm : contre un « témoin réactif ».

2.2.2. *Etalonnage de l'appareil*

Préparer à partir d'une solution étalon d'albumine à 5 g.dm^{-3}, une gamme en quantité contenant de 0 à 5 mg d'albumine par tube.

Traiter les étalons de la même façon que les tubes dosages.

2.2.3. *Questions*

1) Donner le tableau de composition des tubes.

2) Tracer la courbe d'étalonnage A = f (qm protéines en mg) ou utiliser la régression linéaire.

3) Calculer la teneur en protéines du blanc d'œuf, exprimée en g.dm^{-3}.

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Tableau de composition des tubes (tabl. 11.I.)

Tableau 11.I.

N° tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*Dosage*
Blanc d'œuf (cm^3) dilué au 1/250	–	–	–	–	–	–	1
Sérumalbumine à 5 $g.dm^{-3}$ (cm^3)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	–
Solution de NaCl à 9 $g.dm^{-3}$ (cm^3)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	–
Réactif de Gornall (cm^3)	4	4	4	4	4	4	4
Protéines (qm) mg.	0	1	2	3	4	5	X

2.3.2. Calculs

Teneur en protéines du blanc d'œuf en $g.dm^{-3} = 50 \cdot \frac{X}{E}$.

3. DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES DU SÉRUM

• *Consignes de sécurité à respecter pour la manipulation de sérum*

En milieu scolaire, il faut réaliser les dosages de biochimie clinique sur des sérums animaux : sérums de bœuf lyophilisés (Biotrol, Unitrol...) ou sérums frais (sérum de bœuf commercialisé), ou sur du sang animal acheté par exemple chez les charcutiers, chez les vétérinaires ou aux abattoirs.

• *Règles de sécurité à rappeler aux élèves qui feront des stages en laboratoire au cours de leur scolarité*

– Le port des gants à usage unique est obligatoire chaque fois que l'on manipule un produit biologique (sang, plasma, sérum...), même lors de l'utilisation d'un automate.

– Interdiction formelle de pipetage à la bouche. Utiliser soit des pipettes automatiques avec cônes plastiques à usage unique, soit des systèmes d'aspiration électriques ou des poires d'aspiration s'adaptant sur les pipettes classiques.

– Désinfection des mains, systématiquement en fin de manipulation, et en cours de manipulation chaque fois qu'il y a risque, avec de l'alcool à 70 °, durant 1 minute (ou avec un autre antiseptique approprié durant un temps suffisant).

– Désinfection de la verrerie : immersion complète dans un désinfectant approprié durant un temps suffisant (eau de Javel à 12 ° durant quelques minutes).

– Inactivation du matériel à usage unique (cônes, pipettes, gants...) par autoclavage après recueil dans un sac prévu à cet usage.

– Nettoyage de la paillasse, avec de l'eau de Javel diluée au 1/10 (ne pas utiliser une éponge mais un « essuie-tout » en tissu) en respectant un temps de contact d'au moins une minute.

- *Utilisation de la pipette automatique*

Prélèvement :

– Monter le cône approprié sur l'embout porte-cône. Assurer l'étanchéité de la jonction cône-pipette en imprimant un mouvement de rotation.

– Presser le bouton poussoir jusqu'à la première butée ou la deuxième butée (conseillé si E ≤ 100 µl).

– Maintenir la pipette verticale et plonger l'extrémité du cône dans l'échantillon à prélever.

– Relâcher lentement et régulièrement le bouton poussoir pour aspirer le liquide dans le cône.

– Essuyer éventuellement les gouttelettes de liquide qui adhèrent sur les parois extérieures du cône avec du papier non tissé (papier Joseph) sans toucher l'orifice du cône.

Transfert :

– Appuyer l'extrémité du cône contre la paroi du récipient (angle de 10 à 40 degrés).

– Presser doucement le bouton poussoir jusqu'à la deuxième butée ou la première butée (E ≤ 100 µl).

– Tout en maintenant le bouton poussoir complètement pressé, retirer la pipette automatique en glissant le long de la paroi.

– Relâcher le bouton poussoir.

– Ejecter le cône en pressant le bouton de commande de l'éjecteur de cône. Utiliser un nouveau cône si un liquide différent doit être pipetté ou si le volume à prélever est différent du volume précédent.

Remarques :

– Le pré-rinçage du cône est recommandé lors du pipettage de sérum, de solutions protéiques, de solvants organiques.

– En cas de prélèvements de sérum, le port de gants est obligatoire ; le cône souillé et le papier qui a servi à l'essuyer doivent être immédiatement recueillis dans un sac prévu à cet usage pour autoclavage ou dans un bac à eau de Javel.

3.1. Réactifs

- *Réactif de Gornall (en distributeur)* :
- sulfate de cuivre, 5 H_2O : 1,50 g ;
- tartrate double de sodium et de potassium : 6 g ;
- soude : 30 g ;
- iodure de potassium : 1 g ;
- eau distillée : 1 000 cm^3.

Réactif à conserver à l'abri de la lumière, dans un flacon en polyéthylène soigneusement bouché.

- *Eau physiologique* à 9 g $NaCl.dm^{-3}$.
- *Sérum étalon* de concentration connue en g de protéines par dm^{-3}.
 Sérum étalon du commerce ou sérum de bœuf étalonné par gravimétrie ou par la méthode Kjeldahl.
- *Sérum à doser.*

3.2. Fiche technique

3.2.1. Détermination de la protéinémie

Dans un tube à essais, introduire :
- Plasma ou sérum E = 50 µl
- Eau physiologique 50 µl
- Réactif de Gornall 4 ml

Homogénéiser. Laisser reposer 30 minutes à température ambiante (la coloration est stable quelques heures).

Lire au spectrophotomètre à 540 nm après avoir réglé le zéro du spectrophotomètre sur un tube « témoin réactif ».

3.2.2. Etalonnage du spectrophotomètre

A partir d'un sérum étalon de concentration connue en protéines, préparer 6 tubes étalons contenant 0 à 100 µl de sérum étalon.
Traiter les tubes étalons dans les mêmes conditions que les tubes essais.

3.2.3. *Questions*

1) Donner le tableau de composition des tubes.

2) Tracer la courbe d'étalonnage A = f (g protéines.dm^{-3}) ou utiliser la régression linéaire.

3) Déterminer la protéinémie du sérum analysé exprimée en g.dm^{-3}.

Données : valeurs de référence de la protéinémie (masc) 62-80 g.dm^{-3}.

3.3. Mode opératoire

3.3.1. *Tableau de composition des tubes à essais* (tabl. 11.II.)

Tableau 11.II.

N° tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*Dosage*
Sérum (µl)	–	–	–	–	–	–	50
Sérum étalon à 80 g.dm^{-3} (µl)	0	20	40	60	80	100	–
Eau physiologique (µl)	100	80	60	40	20	0	50
Réactif de Gornall (cm^3)	4	4	4	4	4	4	4
Protéines en mg	0	1,6	3,2	4,8	6,4	8	X_m
Protéines masc en g.dm^{-3}	0	16	32	48	64	80	Xρ

Le tableau de composition des tubes à essais est donné à titre d'exemple pour un sérum étalon à 80 g.dm^{-3} soit 80 µg.μl^{-1}.

Le tube n° 3 correspond donc à 80 µg.μl^{-1} x 60 µl = 4 800 µg soit 4,8 mg de protéines ou à une concentration massique de 80 µg.μl^{-1} x 60/100 = 48 µg.μl^{-1} soit 48 g.dm^{-3}.

3.3.2. *Calculs*

Se protéines masc en g.dm^{-3} = $X_m \cdot 1/E = X_m \cdot \frac{1}{50.10^{-3}} = 20 \cdot X_m$

Ou

Se protéines masc en g.dm^{-3} = Xρ · 2 (Xρ étant la concentration massique en g.dm^{-3} du sérum à doser dilué au 1/2 dans le tube dosage).

4. EXERCICES

Exercice n° 1 : dosage des protéines sériques par la méthode du biuret

Le sérum à doser est dilué au 1/20 avec une solution de chlorure de sodium à 9 $g.dm^{-3}$.

A 2 cm^3 de cette solution, on ajoute 8 cm^3 de réactif cuprotartrique de Gornall.

Après 30 min à la température ambiante, l'absorbance est lue à 540 nm contre un témoin réactif.

– Proposer une composition de tubes de gamme préparés à partir d'un sérum étalon à 72 g de protéines par dm^3.

– Etablir la formule littérale donnant la concentration massique du sérum à doser, exprimée en g de protéines par dm^3.

Données : valeurs de référence de la protéinémie (masc) 62-80 $g.dm^{-3}$.

Exercice n° 2 : Dosage des protéines d'un sérum (extrait sujet Bac)

On utilise un sérum de contrôle qui contient 71 g de protéines par litre. Ce sérum est dilué de telle sorte que les masses de protéines dans chaque tube varient de 0,71 mg à 7,1 mg. Le volume de dilution introduit est de 1 cm^3. Les absorbances lues sont indiquées dans le *tableau 11.III*.

Tableau 11.III.

N° tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
Masse de protéines en mg	0	0,71	1,42	2,84	3,55	5,68	7,10
Absorbances	0	0,040	0,080	0,155	0,190	0,320	0,410

1) On effectue le dosage des protéines totales du sérum dans les mêmes conditions que la gamme étalon. Le sérum utilisé est au préalable dilué au 1/20. L'absorbance lue est A_1 = 0,205.

– Quelle est la concentration massique des protéines, exprimée en $g.dm^{-3}$?

2) On dose ensuite une fraction des protéines sériques. Le mode opératoire est le suivant : on mélange 1 cm^3 de sérum, 4 cm^3 d'eau distillée, 5 cm^3 de solution saturée de sulfate d'ammonium. Le précipité de globulines obtenu est dissous dans X cm^3 de solu-

tion de NaCl à 9 g.dm $^{-3}$. On prélève 1 cm^3 de cette solution pour faire le dosage proprement dit.

– Sachant que le rapport albumines/globulines est compris entre 1,2 et 1,8, déterminer la valeur de X (1 ; 10 ; 50 ; 100 ou 200 cm^3) pour que le dosage colorimétrique soit réalisé correctement.

– L'absorbance alors mesurée pour les globulines est A_2 = 0,165. En déduire le taux d'albumines et de globulines.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

Le sérum à doser, dilué au 1/20 a une concentration massique voisine de 3 à 4 g.dm $^{-3}$. Il est possible de préparer une gamme d'étalons de concentrations massiques comprises entre 0 et 8 g de protéines par dm $^{-3}$ après dilution au 1/9 (en tube à essais) du sérum étalon (*tabl. 11.V.*).

Tableau 11.V.

Se protéines masc en g.dm $^{-3}$ = 20.X.

N° tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*Dosage*
Sérum à doser (cm^3) dilué au 1/20	–	–	–	–	–	2
Sérum étalon au 1/9 (cm^3)	0	0,5	1	1,5	2	–
Solution de NaCl à 9 g.dm $^{-3}$ (cm^3)	2	1,5	1	0,5	–	–
Réactif de Gornall (cm^3)	8	8	8	8	8	8
Protéines masc en g.dm $^{-3}$	0	2	4	6	8	X

Exercice n° 2 :

1) Se protéine masc = 3,64 x 20 = 72,8 g/dm $^{-3}$.

2) Les globulines sont précipitées en présence de sulfate d'ammonium à 50 % de saturation puis reprises dans X cm^3 de NaCl à 9 g.dm $^{-3}$. Un cm^3 de la solution X doit avoir,

après addition du réactif de coloration, une absorbance comprise entre 0,15 et 0,20 (milieu de gamme), et donc correspondre à ≈ 3 mg de protéines.

Or, dans le sérum albumines/globulines ≈ 1,5
et [albumines] + [globulines] = 72,8 g.dm $^{-3}$
d'où [globulines] ≈ 30 g.dm $^{-3}$: le sérum doit être dilué au 1/10 pour le dosage des globulines. Soit X = 10 cm^3 de NaCl.

A_2 = 0,165 correspond à 2,93 mg de protéines

[globulines] = 2,93 x 10 = 29,3 g.dm $^{-3}$

[albumines] = 72,8 – 29,3 = 43,5 g.dm $^{-3}$.



COLORIMÉTRIE DES PROTÉINES. COMPARAISON DE DIFFÉRENTES MÉTHODES

SOMMAIRE PAGE

Cette manipulation a pour objet de comparer les caractéristiques de différentes méthodes de dosage colorimétrique utilisées lors de la détermination de quantités de protéines faibles : méthode de Folin-Lowry, méthode de Bradford, et mesure d'absorbance à 280 nm.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **linéarité ;**
- **sensibilité ;**
- **spécificité ;**
- **détectabilité.**

1. PRINCIPE

1.1. Méthode de Folin-Lowry

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique. En présence de protéines, il est réduit en un complexe de coloration bleue.

Les acides aminés, tyrosine, tryptophane, cystéine et dans une moindre mesure histidine, sont partiellement responsables de l'apparition de la coloration qui met cependant en jeu un mécanisme plus complexe, mal connu. L'intensité de la coloration variera en fonction de la structure primaire de la protéine, donc d'une protéine à l'autre.

La méthode de Lowry qui fait précéder la réaction colorée par une action de sels de cuivre, en milieu basique, sur la liaison peptidique augmente la sensibilité.

La mesure de l'absorbance se fait à 600 ou à 750 nm. Elle ne suit pas rigoureusement la loi de Beer-Lambert. La linéarité de la réponse n'est obtenue que pour des concentrations inférieures à 10 $mg.dm^{-3}$.

La spécificité de la méthode est faible : très pratique pour le dosage des extraits protéiques (extraits enzymatiques en cours de purification par exemple), cette méthode se prête mal aux dosages des protéines dans les milieux de composition complexe, milieux biologiques ou produits alimentaires (lait, œufs, céréales...) car de nombreuses substances interfèrent au cours du dosage : sucres, réducteurs, lipides, ions, groupements sulhydryles...

1.2. Méthode de Bradford

En milieu acide, les protéines forment des complexes avec certains colorants organiques, le plus souvent des colorants azoïques à groupements acides sulfoniques, qui se fixent, sur les groupements protonés des chaînes latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine) et sur le α–NH2 libre de la chaîne polypeptidique.

Pour une structure primaire donnée, il existe une bonne corrélation entre la quantité de colorant fixé (donc l'absorbance mesurée) et la concentration en protéines.

Dans la méthode de Bradford, le bleu de Coomassie G250 forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm. La coloration, très sensible, peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30 min si l'on utilise un réactif industriel stabilisé. L'albumine se colore beaucoup plus intensément que les autres protéines et l'on doit en tenir compte lors du choix de l'étalon.

1.3. Méthode de Christian-Warburg

L'absorption des protéines en UV est due :
– à la présence des liaisons peptidiques qui absorbent à 190 nm ;
– à l'absorption de la plupart des acides aminés entre 180 et 220 nm ;
– à l'absorption de la cystine, éventuellement présente dans une structure protéique donnée et qui absorbe à 240 nm ;
– à la présence d'acides aminés aromatiques : essentiellement la tyrosine (maximum d'absorption à 278 nm) et le tryptophane (maximum d'absorption à 279 nm) alors que la phénylalanine absorbe peu la lumière ultraviolette à ces longueurs d'onde (faible absorption à 260 nm) (*fig. 12.1.*).

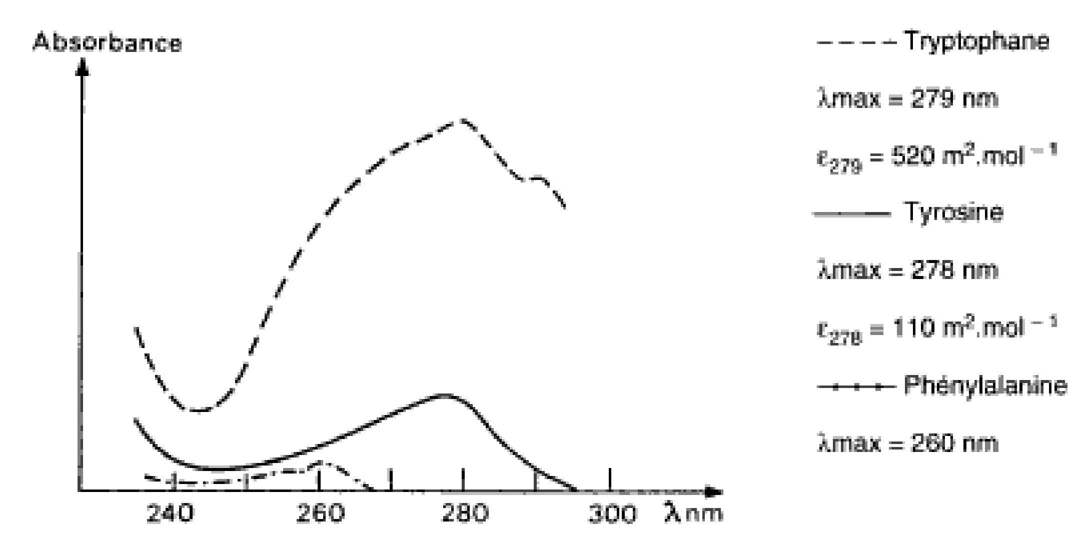


Fig. 12.1. Spectres d'absorption d'acides aminés aromatiques

La plupart des protéines renfermant de la tyrosine, la mesure de l'absorption à 280 nm constitue une méthode extrêmement rapide de mesure de la concentration protéique d'une solution, les autres longueurs d'onde posant de nombreux problèmes de technique et d'interférences.

L'absorbance à 280 nm, essentiellement liée à la teneur de chaque protéine en tyrosine et tryptophane, varie en fonction du pH : une meilleure sensibilité est obtenue à pH 10 quand le groupement phénol de la tyrosine est ionisé.

Les résultats sont satisfaisants sur des solutions protéiques purifiées. Des interférences sont en effet possibles : solutions protéiques non limpides, avec diffusion de la lumière par les particules en suspension ou solutions protéiques renfermant d'autres constituants à caractère aromatique marqué (métabolites, acides nucléiques...) qui absorbent à 280 nm.

Ce dosage présente l'avantage de ne pas détruire les protéines. Il est très utilisé pour repérer ou doser les protéines en sortie de colonne lors d'un fractionnement par chromatographie.

2. RÉACTIFS

• Utiliser une solution de sérum albumine bovine à 2 $g.dm^{-3}$ dans l'eau distillée.

• Comparer les résultats par rapport à une solution aqueuse d'ovalbumine, de gélatine, de lysozyme ou de toute autre protéine pure dont on dispose.

2.1. Méthode de Folin-Lowry

• *Réactif de Folin, commercial* : à diluer 3 fois dans l'eau distillée au moment de l'emploi.

• *Solution réactive* :
– solution A : Na_2CO_3 à 2 % dans NaOH 0,1 $mol.dm^{-3}$;
– solution B : tartrate double de Na et K à 20 $g.dm^{-3}$;
– solution C : sulfate de cuivre à 1 %.

Préparer extemporanément la solution réactive en respectant l'ordre d'addition des réactifs et en agitant bien après chaque addition :
– solution C : 0,5 cm^3
– solution B : 0,5 cm^3
– solution A : 50 cm^3

• *Solution étalon de sérumalbumine bovine* à 2 $g.dm^{-3}$.

2.2. Méthode de Bradford

• *Préparation du réactif de Bradford* :
– dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie G250 (gris, différent du colorant utilisé pour la coloration des protéines) dans 50 cm^3 d'éthanol à 95 % ;
– rajouter 100 cm^3 d'acide phosphorique H_3PO_4 à 85 % ;
– compléter à 1 dm^3 avec de l'eau distillée ;
– filtrer ;
– conserver à l'obscurité, à la température du laboratoire.

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Méthode de Folin-Lowry

3.1.1. Réalisation de la gamme d'étalonnage

– Diluer précisément la solution mère d'albumine à 2 $g.dm^{-3}$ pour l'amener à 0,5 $g.dm^{-3}$.

– Dans une série de tubes à essais, réaliser le tableau de dilutions (*tabl. 12.I.*).

Tableau 12.I.

Tubes n°	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*
Sol. étalon (cm^3)	0	0,2	0,4	0,6	0,8
Eau distillée (cm^3)	1	0,8	0,6	0,4	0,2
Solutions réactive (cm^3)	5	5	5	5	5

– Agiter. Attendre 10 min.

Réactif de Folin au 1/3 (cm^3)	◄---------------------- 0,5 ----------------------►

– Agiter immédiatement chaque tube.
– Laisser la coloration se développer 30 min à l'obscurité.
– Lire l'absorbance contre le blanc de gamme à 650 nm.

3.1.2. *Réalisation d'un essai*

– Diluer la solution à doser de manière à l'amener à environ 0,2 g.dm^{-3} en protéine.
– Mesurer 1 cm^3 de la solution ainsi obtenue.
– Ajouter 5 cm^3 de la solution réactive et traiter dans les mêmes conditions que les tubes de la gamme.
– Les essais seront lus contre le blanc de gamme.

3.2. Méthode de Bradford

3.2.1. *Réalisation de la gamme*

– A partir de la solution mère de sérumalbumine à 2 g.dm^{-3}, on prépare une série de solutions filles dont les concentrations varient de 0,1 à 0,5 g.dm^{-3}.
– Dans une série de tubes à hémolyse, introduire respectivement 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 cm^3.
– Compléter avec de l'eau distillée à 2 cm^3 et homogénéiser.
– Les cinq solutions filles ainsi obtenues permettent de réaliser la gamme d'étalonnage indiquée dans le *tableau 12.II*.

Tableau 12.II.

Tubes n°	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Sol. fille (cm^3)	–	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Eau distillée (cm^3)	0,1	–	–	–	–	–
Réactif de Bradford (cm^3)	5	5	5	5	5	5

– Agiter immédiatement les tubes et lire l'absorbance à 465 nm contre le blanc de gamme.

REMARQUES :

– ce réactif se dépose et adhère à toutes les surfaces ; les absorbances ne seront pas lues dans des cuves à aspiration ;
– une élévation brutale de l'absorbance a souvent pour origine une mauvaise conservation du réactif de Bradford.

3.3. Mesure de l'absorbance à 280 nm

– Préparer une gamme de dilution et compléter le tableau de dilution (*tabl. 12.III.*).

Tableau 12.III.

Tubes n°	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Solution SAB à 2 g.dm $^{-3}$ (cm ^{3})	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (cm ^{3})	1,8	1,6	1,4	1,2	1
Concentration en SAB en g.dm $^{-3}$					

– Lire les différents tubes contre de l'eau distillée en utilisant des cuves quartz ou des cuves plastiques spéciales UV.

3.4. Questions

– Tracer les courbes d'étalonnage : A = f (quantité) ou A = f (concentration).
– Pour chacune des méthodes, vérifier la proportionnalité de la réponse par rapport à la quantité de protéine ou à sa concentration.
– Déterminer la limite supérieure de linéarité.
– Déterminer la sensibilité de la méthode dans le système d'unités utilisées.
– Déterminer la détectabilité x de chaque méthode à partir d'une série de mesures (au minimum une vingtaine effectuées sur le tube 0. Les valeurs mesurées sont traitées statistiquement et l'on calcule la moyenne μ des valeurs lues et la déviation standard s. On prendra : $x = \mu + 3s$ (probabilité de 99,8 %).
– Regrouper les résultats par méthode et éventuellement par nature de protéine dans un tableau.
– Quelle méthode vous semble la plus sensible ?
– Observe-t-on des écarts importants de linéarité ?

4. EXERCICES

Exercice n° 1 :

On veut déterminer la concentration massique en protéines d'un blanc d'œuf. Le blanc d'œuf est recueilli et dilué au 1/10e en eau distillée. On effectue l'essai sur 5 µl de cette dilution dans les conditions décrites en 3.1.2.

• Etablir le protocole pour la réalisation :
– de l'essai ;
– du blanc de gamme.

- La gamme d'étalonnage donne les résultats consignés dans le *tableau 12.IV.*

Tableau 12.IV.

Quantité protéines µg/tube	0	20	40	60	80	100
Absorbance à 700 nm	0	0,127	0,255	0,368	0,463	0,546

- Tracer la courbe d'étalonnage ou calculer la fonction de régression.
- Déterminer la concentration du blanc d'œuf en protéines sachant que la valeur lue pour l'essai est A = 0,262.
- Que pensez-vous de l'allure de la courbe ? Quelles suggestions vous inspire cette allure ?

Exercice n° 2 :

On réalise une gamme d'étalonnage dans les conditions du *tableau 12.III* ; une solution de lysozyme à 1 $g.dm^{-3}$ remplace la solution de SAB à 2 $g.dm^{-3}$.

- Les tubes sont lus en cuves quartz de 1 cm de trajet optique, à 280 nm contre de l'eau distillée.
- On obtient les résultats du *tableau 12.V.*

Tableau 12.V.

Tubes n°	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Absorbance à 280 nm	0,29	0,51	0,78	1	1,25

- Tracer la courbe d'étalonnage.
- Déterminer le coefficient d'absorbance molaire du lysozyme à 280 nm en unités S I (masse moléculaire du lysozyme : 14 700 Da).
- Comparer éventuellement ce résultat à celui obtenu avec la S A B. Comment expliquez-vous les différences ?

Exercice n° 3 :

Lors de la réalisation d'une gamme d'étalonnage, une série de 20 mesures effectuée sur le blanc de gamme a donné les résultats du *tableau 12.VI.*

Tableau 12.VI.

+ 0,000	+ 0,001	+ 0,003	+ 0,000
+ 0,001	+ 0,000	+ 0,002	− 0,000
+ 0,002	+ 0,001	− 0,001	− 0,001
+ 0,000	+ 0,001	+ 0,002	+ 0,000
+ 0,000	+ 0,002	+ 0,001	+ 0,000

• Calculer les paramètres statistiques et les appliquer à la fonction d'étalonnage définie au 3.4.

• Quelle est la détectabilité permise par l'appareil sur lequel ont été effectuées ces mesures ? Appliquer cette réponse aux valeurs obtenues pour les exercices 1 et 2 et déterminer la plus petite quantité de protéine qu'il est possible de détecter dans chaque cas.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

Essai :
– eau distillée : 1 cm^3 ;
– solution à doser : 5 µl.

Le volume de 5 µl mesuré à la pipette automatique est négligeable.

Témoin :
– Eau distillée : 1 cm^3.

Chaque tube sera complété par 5 cm^3 de réactif de coloration et le protocole du 3.1.1 sera suivi intégralement à partir de ce moment.

Fonction de régression : $y = 0{,}005\ x + 0{,}018$ ($r = 0{,}996$).

Concentration du blanc d'œuf : la fonction de régression donne : 48,8 µg de protéine pour le tube essai, soit :
$c = (48{,}8 \times 10^{6})/5 \times 10 \times 10^{-6} = 97{,}6\ g.dm^{-3}$.

La représentation obtenue n'est pas rigoureusement une droite.

Exercice n° 2 :

Fonction de régression : $y = 2{,}471\,x + 0{,}0204$ ($r = 0{,}999$).

La représentation graphique donne pour A = 1 : c = 0,396 $g.dm^{-3}$.

$$\varepsilon = \frac{1}{0{,}1 \times 0{,}396/14700} = 371\ 212\ dm^2.mol^{-1}$$

La différence s'explique essentiellement par la structure primaire des protéines qui varie considérablement d'une protéine à l'autre en ce qui concerne les acides aminés aromatiques.

Exercice n° 3 :

$\mu = 0{,}0007$: $s = 0{,}0011$;

$x = 0{,}0007 + 3 \cdot 0{,}0011 = 0{,}004$;

soit, pour l'exercice 1 : 0,8 µg de protéine ; pour l'exercice 2 : 1,5 µg de protéine.



DOSAGE DES PROTÉINES SÉRIQUES PAR GRAVIMÉTRIE

SOMMAIRE

Les méthodes gravimétriques ont pratiquement disparu des laboratoires depuis l'essor des appareils de mesures physicochimiques et des automates.

Ces méthodes, condamnées pour leur lenteur, peu compatible avec une notion de rentabilité au sein du laboratoire, et pour leur domaine d'application limité aux macrodosages, présentent encore un double intérêt en milieu scolaire :

- **elles procèdent par de longues étapes de précipitations, de filtrations, de lavages et de séchage qui nécessitent beaucoup de soin de la part du technicien et sont donc formatrices ;**
- **elles procèdent par pesée et sont donc affectées d'une bonne précision par rapport à d'autres méthodes de dosage plus rapides mais souvent moins précises.**

Le but de cette manipulation est :

- **de présenter une technique fondamentale permettant l'étalonnage ou le contrôle d'autres procédés de dosage des protéines, plus rapides ;**
- **de déterminer la teneur en protéines du sérum.**

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **précipitations ;**
- **thermocoagulation ;**
- **pH et concentration saline ;**
- **relargage ;**
- **pesée à masse constante.**

Les consignes de sécurité relatives à l'utilisation et au stockage des solvants organiques sont à respecter scrupuleusement lors de cette manipulation.

1. PRINCIPE

Les protéines sont précipitées ou coagulées. Le précipité est lavé et débarassé de ses impuretés (sels minéraux, lipides, etc.) puis isolé par filtration, séché et pesé.

La précipitation peut être réalisée à froid ou à chaud :
– à froid, on utilise des solvants organiques plus ou moins dénaturants (alcool-acétone, méthylal-méthanol) ou des réactifs de défécation (acide trichloracétique, etc.) ;
– à chaud, le pH et la concentration saline étant convenablement choisis, on opère en milieu aqueux simple ou additionné de méthanol ou d'éthanol.

Le lavage est réalisé à l'eau, ce qui permet d'entraîner les sels minéraux. Les lipides sont dissous et éliminés par un solvant organique.

La filtration est lente. On peut opérer par centrifugation mais la séparation est souvent incomplète.

Le séchage est facilité par un lavage préalable à l'alcool absolu puis à l'éther. Ces lavages déshydratent le précipité. On sèche à l'étuve à 100-105 °C jusqu'à poids constant.

2. RÉACTIFS

- Sérum à doser.
- Rouge de méthyle.
- Acide acétique au 1/10e.
- Ethanol à 95 °GL.
- Ethanol absolu.
- Ether.

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Dosage des protéines totales

On précipite les protéines par thermocoagulation en milieu alcoolique.

3.1.1. Filtration

Equilibrer deux filtres préalablement séchés 10 min à 100-105 °C.

3.1.2. Thermocoagulation

Dans un erlen de 50 cm^3, introduire :
– 2 cm^3 de sérum ;
– 2 gouttes de rouge de méthyle ;
– de l'acide acétique au 1/10e jusqu'à un pH environ égal à 5. (Cette opération peut être suivie sur un témoin à l'aide de papier pH, ce qui permet de caractériser la couleur du rouge de méthyle à pH 5.)

Verser lentement et en agitant 20 cm^3 d'éthanol à 95 °GL.

Adapter sur la fiole une canne de verre servant de réfrigérant à air.

Plonger dans un bain-marie bouillant pendant 5 min.

3.1.3. Lavage

Disposer les filtres sur un entonnoir de Büchner.

Verser lentement le mélange alcoolique bouillant au centre du filtre.

Laver le précipité avec 60 à 80 cm^3 d'eau distillée bouillante.

Rincer la fiole. Lorsque le lavage est terminé, le filtrat doit être limpide.

Laver avec 20 cm^3 d'éthanol absolu bouillant (lentement et en le distribuant sur la totalité du précipité).

Laver avec 15 à 20 cm^3 d'éther en opérant de façon identique.

Laisser évaporer.

3.1.4. Séchage. Pesée

Lorsque l'évaporation de l'éther est totalement achevée (ne pas évaporer l'éther dans une étuve : très dangereux), introduire filtres et précipité dans l'étuve à 100-105 °C et sécher durant 1 h.

Séparer les deux filtres : sur le filtre supérieur se trouve le précipité. La masse du filtre inférieur est déterminée et défalquée de la masse de l'ensemble filtre supérieur et précipité. La différence représente la masse du précipité de protéines.

Répéter le chauffage à l'étuve pendant des périodes de 30 à 60 min jusqu'à poids constant.

Soit m la masse ainsi pesée.

4. RÉSULTATS

Calculer la concentration en protéines totales ρ, évaluée en g/l de sérum :

$$\left[\rho = \frac{m \times 1\,000}{2} \text{ g/l}\right]$$



DOSAGE DES IONS SULFATES PAR OPACIMÉTRIE

SOMMAIRE PAGE

La photométrie en milieux troubles procède :

• par opacimétrie ou turbidimétrie : méthodes d'estimation d'un trouble par mesure de la lumière transmise à travers le milieu analysé ;

• par néphélométrie : méthode d'estimation d'un trouble par mesure de la lumière diffusée par le milieu analysé.

L'opacimétrie et la turbidimétrie sont utilisées :

• en agro-alimentaire, par exemple lors du contrôle de l'épuration des eaux, lors du contrôle des boissons (eaux de consommation, jus de fruits, boissons fermentées) ;

• en microbiologie lors de l'étude de la croissance microbienne ;

• en biochimie clinique pour le dosage des protéines (l'albumine urinaire par exemple).

La néphélométrie est actuellement utilisée pour le dosage de complexes anti-corps-antigènes particulaires.

Le but de cette manipulation est de déterminer la teneur en ions sulfates d'une eau de consommation.

1. PRINCIPE

Le soufre est un élément « majeur » qui se prête mal aux analyses physicochimiques actuelles.

Il est présent sous des formes très diverses : sulfates, sulfites, sulfures, et soufre organique qui pose des problèmes lors de la minéralisation.

Après oxydation complète, la teneur en soufre est déterminée par précipitation des ions sulfates formés, sous forme de sulfate de baryum.

La mesure du précipité obtenu peut être réalisée, par gravimétrie, par conductimétrie, ou par opacimétrie–néphélométrie.

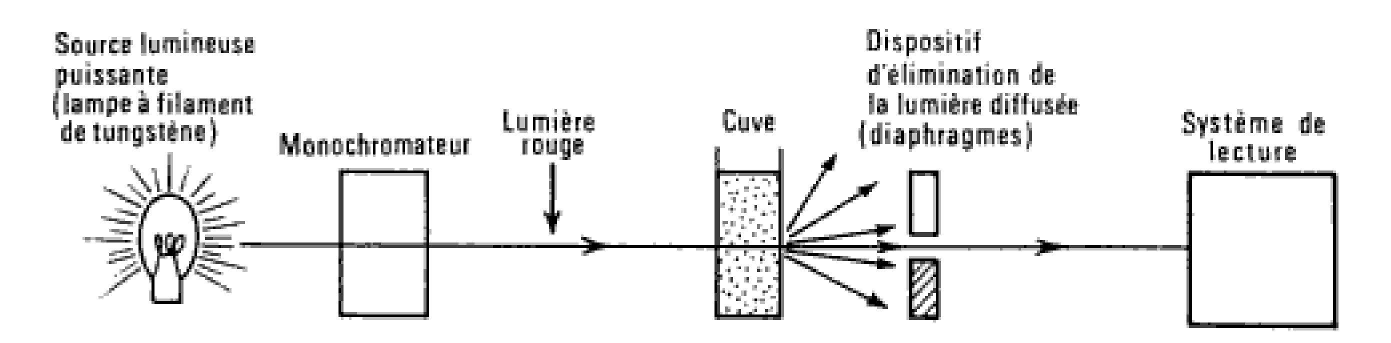


Fig. 14.1. Schéma d'un opacimètre

Un spectrophotomètre qui élimine la lumière diffusée peut être utilisé comme opacimètre.

L'intensité du flux lumineux qui traverse la suspension de particules à doser est diminuée car une partie de la lumière a diffusé et se trouve déviée par rapport à l'axe du flux incident.

La baisse d'intensité est liée à la teneur des particules en suspension.

L'absorbance mesurée suit la loi de Beer–Lambert, pour des suspensions peu concentrées de particules de petite taille.

Les ions sulfates de l'eau à analyser sont précipités en présence de chlorure de baryum en excès :

$$SO_4^{2-} + Ba^{2+} \longrightarrow \underset{\swarrow}{BaSO_4}$$

Le précipité ainsi obtenu est homogénéisé et l'absorbance mesurée au spectrophotomètre est proportionnellle à la quantité d'ions sulfates présents.

2. RÉACTIFS

- *Solution de polyvinyl–pyrrolidone ou de « Tween 20 » à 25 %.*
- *Solution de chlorure de baryum stabilisée* :

– chlorure de baryum : 10 g ;
– solution de « Tween 20 » : 20 cm^3 ;
– eau distillée q s p : 100 cm^3.

- *Acide chlorhydrique au 1/10.*
- *Sulfate de sodium* pur pour analyses et anhydre (masse molaire = 142,04 g. mol^{-1}).
- *Eau à analyser.*

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Réaction de précipitation

Dans un tube à essais, introduire successivement :
- eau à analyser, diluée au 1/20 : 39 cm^3 ;
- acide chlorhydrique au 1/10 : 1 cm^3 ;
- solution de chlorure de baryum stabilisée : 5 cm^3.

Agiter 2 ou 3 fois énergiquement. Après 15 min de repos, agiter à nouveau et faire la lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 650 nm.

3.2. Etablissement de la courbe d'étalonnage

3.2.1. Préparation de la solution étalon

Préparer par pesée U = 100 cm^3 d'une solution à 1,775 g de sulfate de sodium anhydre par dm^3.

3.2.2. Préparation de la gamme d'étalons

A partir de la solution étalon précédente, préparer une gamme d'étalons contenant de 0 à 1,2 mg d'ions sulfates (SO_4^{2-}) par tube.

Agiter 2 ou 3 fois énergiquement. Après 15 min de repos, agiter à nouveau et faire la lecture au spectrophotomètre, à la longueur d'onde de 650 nm, contre un témoin réactif.

3.3. Questions

Déterminer la teneur en sulfates exprimée en milligrammes d'ions SO_4^{2-} par dm^3 d'eau à analyser.

Données : Na = 23 $g.mol^{-1}$; S = 32 $g.mol^{-1}$; O = 16 $g.mol^{-1}$.

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. Tableau de composition des tubes

4.1.1. *Préparation de la solution étalon*

Peser :
– Na_2SO_4 pur et anhydre : 0,1775 g ;
– eau distillée q s p : 100 cm^3.

4.1.2. *Préparation de la gamme d'étalons*

La solution étalon préparée par pesée a pour concentration molaire C = 0,0125 $mol.dm^{-3}$. Elle renferme donc 1,2 mg d'ions sulfate par cm^3.

Il faut diluer cette solution étalon au 1/10 (0,12 mg d'ions $SO_4^{2-} \cdot cm^{-3}$) ou au 1/20 (0,06 mg d'ions $SO_4^{2-} \cdot cm^{-3}$) (*tabl. 14.I*).

Tableau 14.I.

N° tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*Dosage*
Solution étalon diluée au 1/10 (cm^3)	0	2	4	6	8	10	–
Eau bidistillée (cm^3)	39	37	35	33	31	29	–
				ou			
Solution étalon diluée au 1/20 (cm^3)	0	4	8	12	16	20	–
Eau bidistillée (cm^3)	39	35	31	27	23	19	–
Eau à analyser diluée au 1/20 (cm^3)	–	–	–	–	–	–	39
HCl au 1/10 (cm^3)	1	1	1	1	1	1	1
$BaCl_2$ (cm^3)	5	5	5	5	5	5	5
SO_4^{2-} qm en mg	0	0,24	0,48	0,72	0,96	1,2	X

4.2. Calculs

Concentration massique en mg d'ions SO_4^{2-} par dm^3 = $X \cdot \frac{10^3}{39} \cdot 20 = \frac{20\,000}{39} \cdot X$



CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE PAR GEL-FILTRATION

SOMMAIRE

Le but de cette manipulation est :

• d'étudier la technique de chromatographie sur colonne (montage, précautions expérimentales, suivi d'élution) ;

• de caractériser le comportement d'un soluté ;

• d'appliquer la chromatographie de filtration sur gel (ou d'exclusion–diffusion) au dessalage d'une protéine obtenue par relargage.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **gel ou tamis moléculaire ;**
- **limite d'exclusion ;**
- **effluant ;**
- **volume d'élution (ou temps d'élution) ;**
- **volume mort ;**
- **coefficient de distribution K_D ;**
- **efficacité de la colonne expérimentale pour le nombre de plateaux théoriques N ;**
- **optimisation.**

1. PRINCIPE

Le gel de la phase stationnaire est caractérisé par le diamètre de ses pores. Les très grosses molécules sont exclues et sortent en premier dans le volume mort v_o. Les plus petites molécules entrent dans les mailles du gel et se déplacent plus lentement ; à la limite, les très petites molécules diffusent librement et leur volume d'élution est égal au volume total de la colonne v_t.

Le gel utilisé est du Sephadex G_{25} dont la limite d'exclusion est de 5 000 Daltons.

• Dans un premier temps, on suivra la séparation d'un mélange de bleu Dextran (masse molaire égale à 2.10^6 Daltons) totalement exclu et de vitamine B_{12} (masse molaire 1357) en recueillant l'effluant par fractions de volume identique. Les molécules étant colorées, on suivra aisément leur élution.

• Dans un deuxième temps, on analysera un mélange d'albumine et de sulfate d'ammonium. On suivra l'élution de la protéine de masse molaire 65 000 Da, donc exclue, en mesurant l'absorbance à 280 nm des différentes fractions et l'élution des ions sulfate par opacimétrie.

En présence de chlorure de baryum les ions SO_4^{2-} forment un précipité blanc :

$$[Ba^{2+} + SO_4^{2-} \dashrightarrow BaSO_4 \downarrow]$$

A faible concentration, l'« absorbance » est proportionnelle à la concentration en sulfate.

On pourra ainsi traduire l'élution des deux molécules par un diagramme.

Si on étalonne les spectrophotomètres pour ces deux dosages, on pourra évaluer les pourcentages de récupération des deux molécules.

2. PRODUITS ET MATÉRIEL

2.1. Produits et solutions

• Gel Sephadex G_{25} fine (fourni par Pharmacia) préalablement gonflé dans l'eau physiologique.

• Mélange (1) :
– bleu Dextran : 2 $mg.cm^{-3}$;
– vitamine B_{12} : 0,12 $mg.cm^{-3}$.

• Mélange (2) :
– sérum albumine : 2 $g.dm^{-3}$;
– $(NH_4)_2SO_4$: 50 $g.dm^{-3}$.

• Solutions pour étalonner le spectrophotomètre :
– sérum albumine à 1 $g.dm^{-3}$;
– $(NH_4)_2SO_4$ à 3 $g.dm^{-3}$;
– $BaCl_2$ à 50 $g.dm^{-3}$.

• NaCl à 9 $g.dm^{-3}$.

2.2. Matériel minimum pour réaliser une chromatographie liquide basse pression

- Colonne en verre de 1 cm de diamètre, 25 cm de longueur munie d'un robinet.
- Laine de verre.
- Réservoir de phase mobile.
- Collecteur de fractions (sinon tubes à hémolyse « jaugés » à 1 et 1,5 ml).
- Spectrophotomètre réglable à 280 nm et 650 nm.
- Cuves plastiques spéciales pour mesures en UV (fournisseur Kartell).

2.3. Montage plus élaboré

- Pompe péristaltique à débit constant et réglable.
- Colonne de chromatographie réglable avec accessoires.
- Système d'injection de l'échantillon.
- Système de détection et d'enregistrement en continu.

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Conditions opératoires et précautions générales dans une expérience de chromatogaphie sur colonne

3.1.1. Choix et conditionnement du gel

Dans cette manipulation, le choix est facile puisque la différence de masse molaire entre les deux molécules à séparer est importante. Le Sephadex G_{25} combine une bonne rigidité et de bonnes caractéristiques de débit. Il est fourni sous forme sèche ; il est donc indispensable de faire gonfler les billes de gel dans un excès de solvant sans agitation, pendant trois heures à température ambiante. Puis dégazer le gel sous vide pendant quelques minutes avant son utilisation (prévoir une fiole de garde). On peut également dégager le gel dans une cuve à ultrasons.

3.1.2. Choix de la colonne et remplissage par voie humide

Les caractéristiques de la colonne sont importantes :
– volume mort à la sortie minimum ;
– taille : la résolution augmente proportionnellement à la racine carrée de la longueur et le diamètre dépend de la quantité d'échantillon à analyser mais reste de l'ordre du 1/15 de la longueur.

Pour le remplissage :
– verser la suspension de gel bien homogène en une seule fois ;
– s'assurer qu'aucune bulle d'air n'est emprisonnée dans le volume mort sous le filtre ;
– attendre la décantation du gel ;
– équilibrer le gel avec la phase mobile ;
– éliminer l'excès de phase mobile et ne jamais laisser la colonne à sec.

3.1.3. Dépôt de l'échantillon à analyser

- Choisir un faible volume d'échantillon (1 à 5 % du volume total du gel).
- Déposer délicatement l'échantillon en évitant toute perturbation à la surface du gel.
- Ouvrir la colonne jusqu'à pénétration complète de l'échantillon.
- Eliminer par lavage avec un petit volume d'éluant les traces d'échantillon restant sur la paroi de la colonne.

3.1.4 Choix de l'éluant et mise en route de l'élution

Dans ce type de chromatographie, la composition de l'éluant ne modifie pas directement la résolution. On peut choisir une solution saline, un tampon ou de l'eau distillée.

– Vérifier la pression de travail.

– Ouvrir la colonne et commencer l'élution qui se fait par gravité. Régler le débit en manœuvrant le robinet. Une pompe péristaltique en permet un contrôle plus régulier. Toujours choisir un débit faible (environ 1 cm^3 pour 4 minutes).

– Recueillir des fractions d'égal volume.

3.1.5. Analyse des substances éluées

Elle peut s'effectuer directement lorsque des mesures physiques sont réalisables ou après une réaction chimique de révélation.

L'analyse peut être qualitative (apparition d'une couleur, d'un précipité, identification par CCM) ou quantitative si on travaille sur un volume d'éluant précis et si on se réfère à des solutions standards.

3.1.6. Conservation du gel

Le gel peut être utilisé de nombreuses fois à condition de le protéger contre toute contamination microbienne. Conserver le Sephadex G_{25} à l'état gonflé, en réfrigérateur, en présence d'une solution à 2 $g.dm^{-3}$ en azide de sodium.

3.2. Montages

Les montages sont à réaliser suivant deux possibilités : première possibilité (*fig. 15.1a*) et seconde possibilité (*fig. 15.1b*).

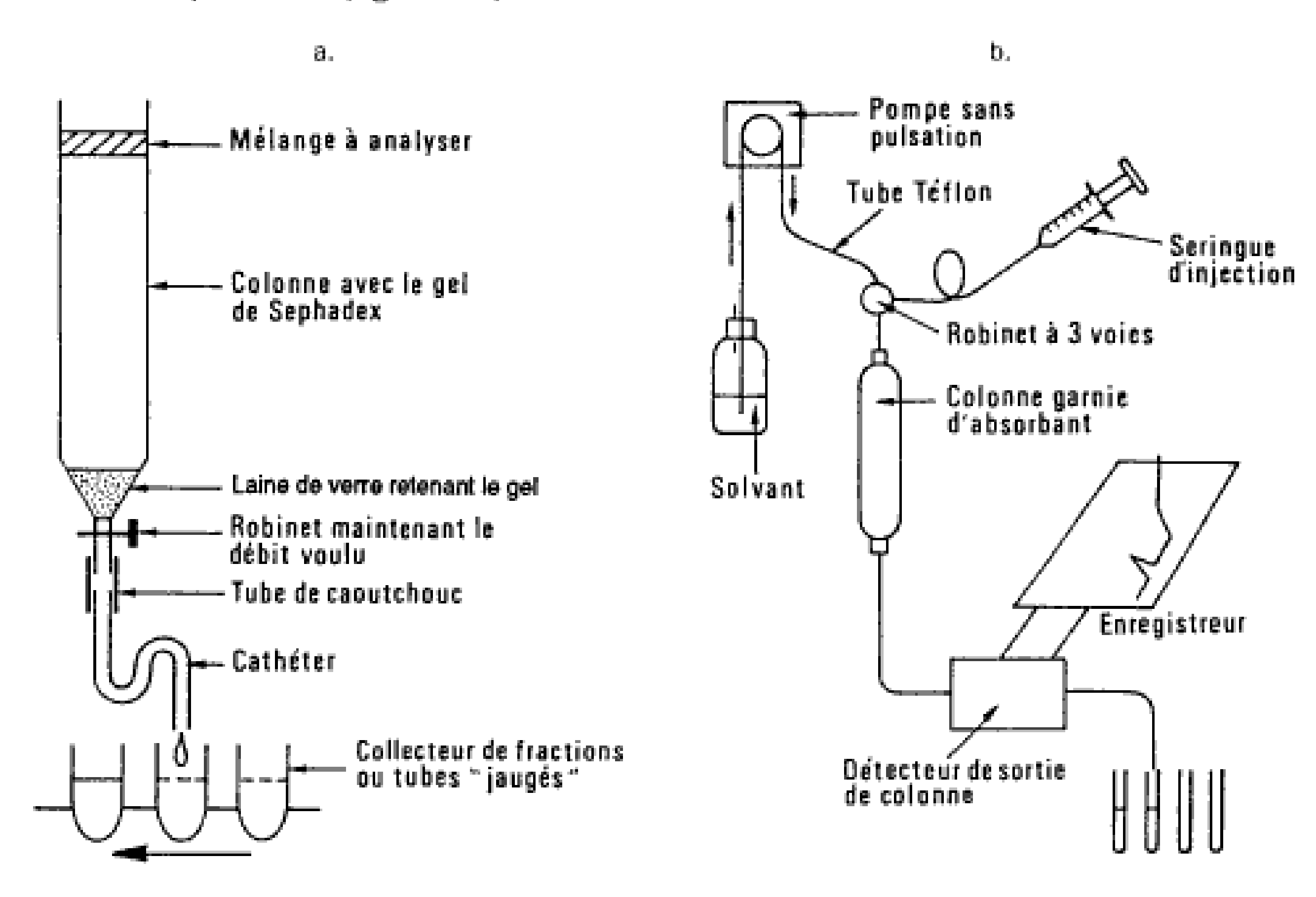


Fig. 15.1. Montages réalisables par chromatographie sur colonne par gel-filtration

3.3. Conduite de la chromatographie

3.3.1. Etude de quelques paramètres

Manipulation

Travailler avec 6 grammes de Sephadex G_{25} fine gonflé dans l'eau physiologique dans une colonne de 25 cm de hauteur et 1 cm de diamètre.

Déposer 0,5 cm^3 du mélange.

Déclencher le collecteur de fractions et éventuellement l'enregistreur.

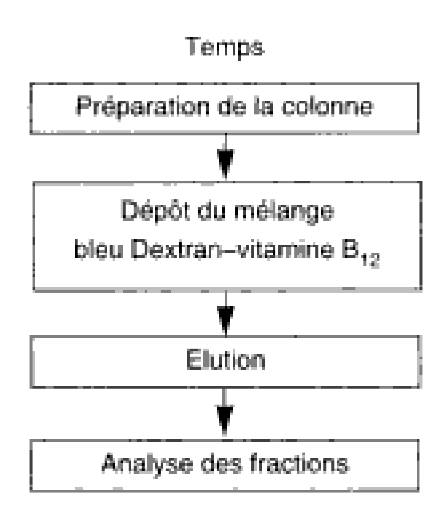
Eluer avec de l'eau physiologique.

Maintenir un débit de 0,3 cm^3 par minute.

Recueillir l'effluent par fractions de 1,5 cm^3.

Observer la migration du bleu Dextran.

Repérer visuellement :
– le volume d'élution du bleu Dextran* ;
– le volume d'éluant contenant le bleu Dextran ;
– le volume d'élution de la vitamine B_{12} ;
– le volume d'éluant contenant la vitamine B_{12}.



REMARQUES :

• *Si on dispose d'un détecteur en continu :*
– *suivre l'élution à 280 nm ;*
– *faire un enregistrement des spectres d'absorption des deux molécules.*

• *Si on ne dispose pas de détecteur, et en fonction du temps disponible, on pourra mesurer l'absorbance des différentes fractions.*

3.3.2. Dessalage d'une solution de sérumalbumine

Sur la même colonne :
– déposer 0,5 cm^3 d'un mélange de sérumalbumine et de sulfate d'ammonium ;
– établir une pression de tête de 25 cm de hauteur, maintenir le débit à 0,3 cm^3 min^{-1} et recueillir des fractions de 1 cm^3 ;
– mesurer l'absorbance à 280 nm des fractions** ;
– doser les ions sulfates sur 0,2 cm^3 de chaque fraction ;
– mesurer la hauteur de gel dans la colonne ;
– récupérer le gel et le conserver ;
– mesurer le volume v_T de la colonne en la remplissant avec de l'eau distillée jusqu'au niveau d'origine du gel.

---

* La migration du bleu Dextran permet d'évaluer la qualité du gel : si la migration n'est pas satisfaisante recommencer le remplissage.
** On pourrait faire un dosage colorimétrique type Folin–Lowry sur 0,6 cm^3 de chaque fraction (voir chapitre 12).

3.3.3. *Dosage opacimétrique des ions sulfates*

- A partir de la solution mère de $(NH_4)_2SO_4$ à 3 g.dm^{-3}, réaliser trois solutions filles à 0,3, 0,6 et 1,5 g.dm^{-3}.

- Pipeter dans chaque cuve :
– 0,2 cm^3 de chacune des solutions à analyser (solutions étalons, fractions éluées, mélange analysé dilué 50 fois) ;
– 0,2 cm^3 de $BaCl_2$ à 50 g.dm^{-3} ;
– 1,6 cm^3 d'eau déminéralisée.

- Agiter et lire immédiatement « l'absorbance » à 650 nm.

3.3.4. *Dosage spectrophotométrique de l'albumine*

Mesurer l'absorbance à 280 nm d'une solution étalon et du mélange analysé.

4. EXPLOITATION DES RÉSULTATS

4.1. Analyse qualitative

4.1.1. *A partir de la première expérience*

- Déterminer le v_0 de la colonne et le volume d'élution v_e de la vitamine B_{12}. Le comparer avec le volume total v_T. Conclure sur le comportement chromatographique de la vitamine B_{12}.

- Si on appelle facteur de dilution le rapport : $\dfrac{\text{volume d'éluant contenant la substance}}{\text{volume déposé}}$

le calculer pour le bleu Dextran et pour la vitamine B_{12}. Conclure.

- Si on dispose d'un détecteur en continu :
– comparer l'allure des deux pics d'élution ;
– pourquoi peut-on utiliser un détecteur réglé à 280 nm ?

4.1.2. *A partir de la deuxième expérience*

- Tracer le profil d'élution de l'albumine et des ions sulfate. Discuter le résultat obtenu.

- Déterminer les volumes d'élution des deux molécules et discuter les valeurs trouvées.

- Calculer le facteur de dilution pour l'albumine.
- Pour les ions sulfates, calculer les trois paramètres caractérisant le comportement d'un soluté et indépendants des caractéristiques géométriques de la colonne :

– volume d'élutions relatifs $\frac{v_e}{v_O}$ et $\frac{v_e}{v_T}$;

– coefficient de partage accessible $K_{av} = \frac{v_e - v_O}{v_T - v_O}$.

Peut-on calculer K_D ? (Rechercher éventuellement la documentation nécessaire.)

- En utilisant le pic d'élution de l'albumine, calculer le nombre de plateaux théoriques N par mètre. En déduire la hauteur équivalente d'un plateau théorique HEPT.

On précise que pour un pic chromatographique gaussien (*fig. 15.2.*) N peut être calculé à partir de l'une des deux expressions suivantes :

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \text{ ou } N = 5{,}545\left(\frac{t_R}{\delta}\right)^2$$

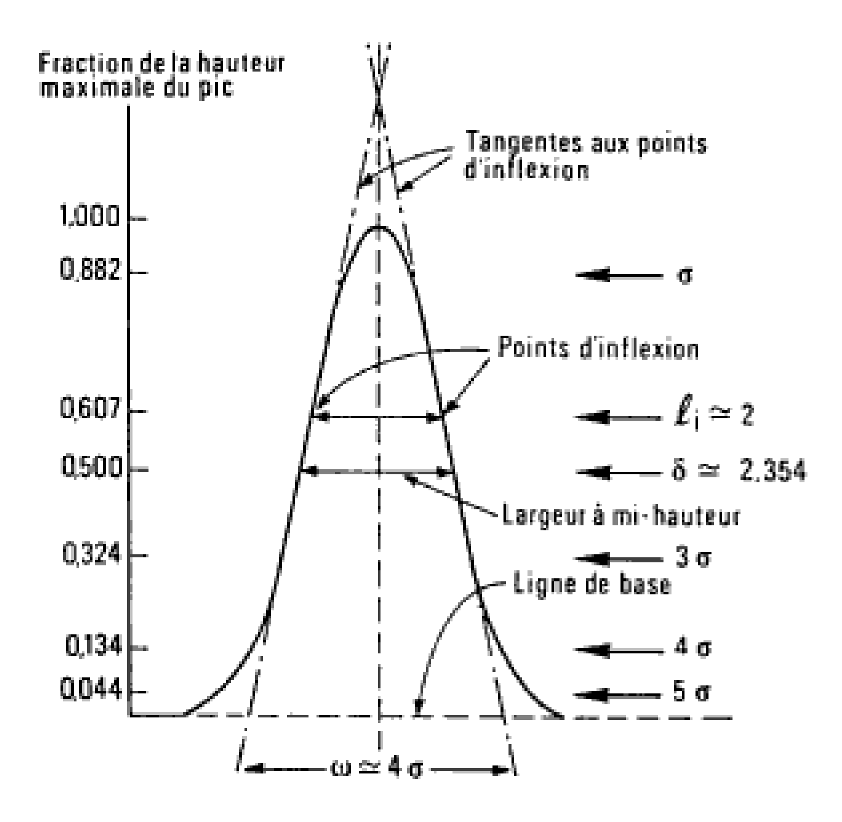


Fig. 15.2. Largeurs caractéristiques d'un pic gaussien

Le HEPT a pour dimension une longueur : elle est égale à $\frac{L}{N}$ où L égale la longueur de la colonne.

4.2. Analyse quantitative

- Présenter un tableau (comme *tableau 15.I.*).

Tableau 15.I.

Numéro des fractions	*1*	*2*	*3*	*4*
Absorbance à 280 nm				
XXX de sulfate d'ammonium				

- Exprimer les concentrations du mélange initial en $g.dm^{-3}$ d'albumine et en $g.dm^{-3}$ de $(NH_4)_2\ SO_4$.
- Calculer les pourcentages de récupération pour l'albumine et pour les ions sulfate. Commenter les résultats obtenus.
- Conclure sur l'optimisation possible de la manipulation d'après les critères suivants :

– qualité de la séparation ;
– pourcentage de récupération ;
– dilution de l'albumine ;
– durée de la manipulation.

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Quelles autres techniques de dessalage d'une solution protéinique peut-on utiliser ? En discuter les avantages et les inconvénients.

Exercice n° 2 :

Sachant que le pouvoir de résolution R_S est proportionnel à la racine carrée de la hauteur de gel, calculer la hauteur de gel minimale utilisable dans l'expérience de dessalage pour avoir un R_S correct de 1,5.

Exercice n° 3 :

Rechercher dans un catalogue les modifications de gel qui ont élargi le domaine d'application de la technique.

Exercice n° 4 :

Utilisation d'un gel pour la purification d'une protéine A à partir d'un mélange M de trois protéines A, B et C dont les masses molaires sont respectivement égales à 3.10^4, 5.10^4 et 10^5 D. Quel gel peut-on choisir ? Justifier la réponse.

Données : courbes de sélectivité de gels Sephadex type G (*fig. 15.3.*).

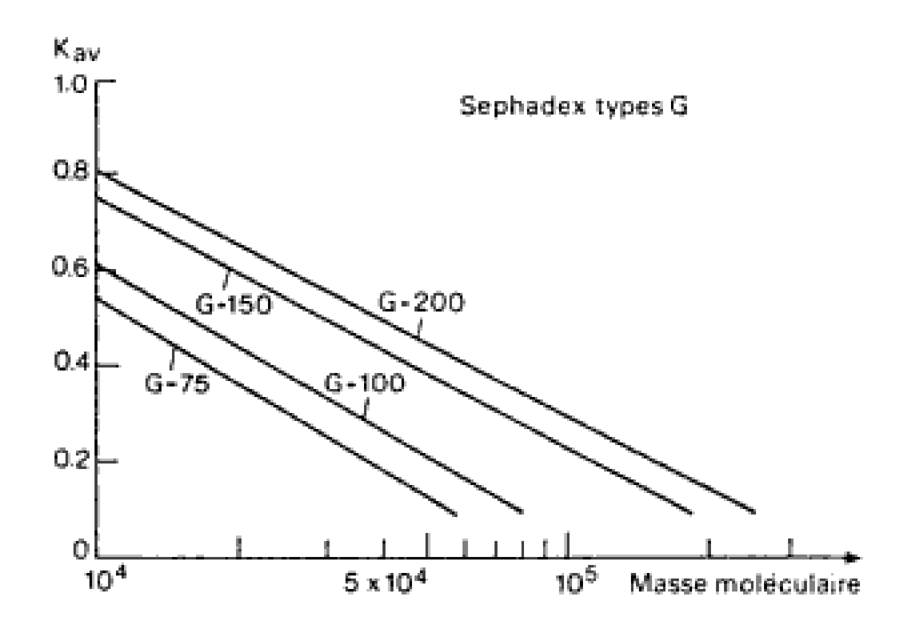


Fig. 15.3. Courbes de sélectivité : Sephadex type G (pour des protéines globulaires)

Exercice n° 5 :

Que faire dans les cas suivants d'anomalie :
- craquelure dans le lit du gel ;
- progression irrégulière de l'échantillon dans le gel ;
- faible résolution ;
- absence d'écoulement.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

- Dialyse et ultrafiltration.
- Etude comparée.

	Gel–filtration	Dialyse	Ultrafiltration
Coût	faible	faible	élevé
Durée	rapide	très long	rapide
Récupération des petites molécules	bonne	impossible	difficile
Dilution	assez élevé	faible	faible

Exercice n° 2 :

$$R_S = k\sqrt{L}$$

Soit R_{S_1} le résultat obtenu pour une hauteur de gel L1 au cours du TP :

$$Lx = L_1\left(\frac{1{,}5}{R_S}\right)^2$$

Exercice n° 3 :

– Modification de la nature chimique du gel ;
– Utilisation d'autres molécules de pontage ;
– fixation de ligands variés ;
ont permis d'augmenter la stabilité chimique, la stabilité thermique et d'élargir les domaines d'application.

Exercice n° 4 :

Gel 2 (volume d'élution très différent des volumes d'élution de B et C).

Exercice n° 5 :

• *Craquelure* (prise d'air importante ou colonne violemment déplacée) : vérifier toutes les connections et reconditionner la colonne.

• *Progression irrégulière de l'échantillon dans le gel* : (colonne mal conditionnée) : reconditionner la colonne, en évitant une trop forte pression et améliorer la fluidité de la suspension de gel.

• *Faible résolution* : vérifier la courbe de sélectivité et éventuellement choisir un autre gel ; voir si le volume d'échantillon n'est pas trop important ; utiliser une colonne plus longue ; choisir un débit plus faible.

• *Absence d'écoulement* : vérifier que la valve de sortie n'est pas fermée ; vérifier la pression à la pompe, s'assurer qu'il n'y a pas de fuites aux connections.



PURIFICATION ET ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DE L'ADN

SOMMAIRE PAGE

Le but la manipulation est :

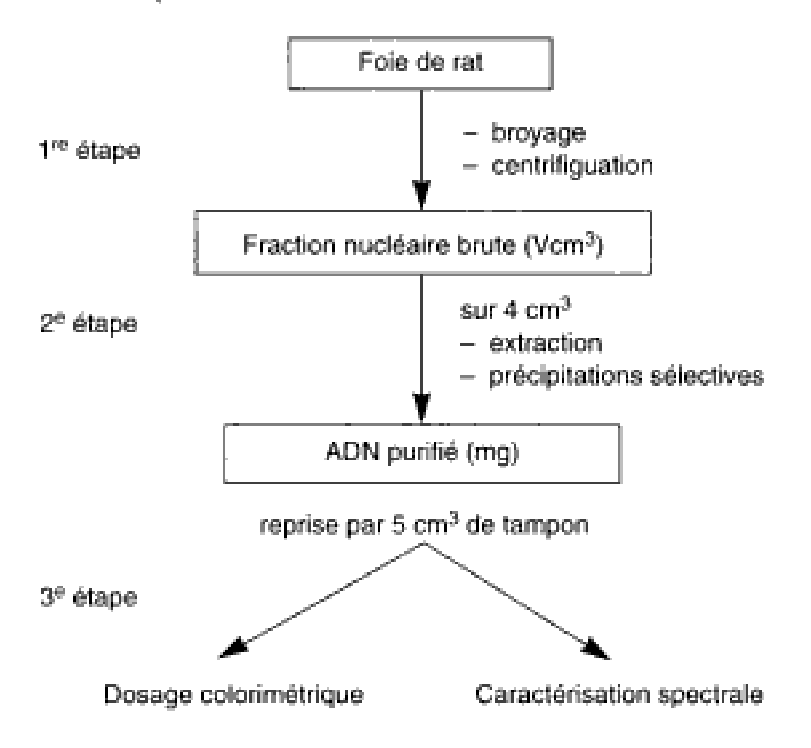
- **d'isoler les noyaux de cellules de foie de rat puis d'en extraire et purifier l'ADN ;**
- **de doser l'ADN obtenu par colorimétrie et par spectrophotomètrie en UV.**

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **centrifugation différentielle ;**
- **broyage ;**
- **extraction ;**
- **précipitation sélective ;**
- **caractérisation spectrale.**

1. PRINCIPE

Schéma résumant la manipulation :



• Dans un premier temps, on détruit la structure cellulaire du tissu animal par broyage puis on isole les noyaux par centrifugation horizontale.

• Dans un deuxième temps, on extrait et on purifie l'ADN des noyaux par élimination successives des protéines associées, des lipides et de l'ARN.

Les protéines sont dissociées de l'ADN à l'aide de détergent (SDS) et de perchlorate de sodium. L'addition d'un solvant organique non miscible (chloroforme contenant un peu d'alcool isoamylique comme agent anti-moussant) permet d'éliminer les lipides et de coaguler les protéines. A pH 8,3, les acides nucléiques : ADN et ARN sont extraits dans la phase aqueuse. Après séparation des phases, l'ADN est précipité sélectivement par addition d'éthanol.

• Dans un troisième temps, on analyse l'ADN purifié obtenu :
– par dosage colorimétrique en utilisant la diphénylamine qui forme un complexe coloré en bleu avec le désoxyribose ;
– par étude spectrale en évaluant le rapport $\frac{A_{260\ nm}}{A_{280\ nm}}$ qui permet d'apprécier l'efficacité du procédé de purification.

2. PRODUITS ET MATÉRIEL

• Rat.

• Solution STE :
– saccharose : 250 mmol.dm $^{-3}$;
– EDTA : 1 mmol.dm $^{-3}$;
– Tris–HCl : 5 mmol.dm $^{-3}$ pH 7,2.

• Tampon TE :
– tampon Tris : 10 mmol.dm $^{-3}$;
– EDTA : 1 mmol.dm $^{-3}$ pH 8,3.

• SDS : 250 g.dm $^{-3}$.

• $NaClO_4$: 5 mol.dm $^{-3}$.

• Mélange chloroforme, alcool isoamylique (24 : 1, v/v).

• Ethanol 95°.

• Solution standard d'ADN à 400 mg.cm $^{-3}$ (100 mg d'ADN dans 250 cm^3 d'acide trichloracétique à 5 %). La solubilisation se fait à 90 °C) (Référence : DNA from Calf Thymus Sigma, D 1501.)

• Acide trichloracétique à 50 g.dm $^{-3}$.

• Réactif à la diphénylamine : dissoudre 0,6 g de diphénylamine fraîche (ou recristallisée dans l'éther de pétrole) dans 60 cm^3 d'acide acétique glacial. Ajouter 1,75 cm^3 d'acide sulfurique concentré.

• Centrifugeuse réfrigérée avec rotor pour centrifugation horizontale.

• Tube à centrifuger en verre de forme conique.

• Broyeur de Potter.

• Bain-marie à 60 °C.

3. PROTOCOLE

3.1. Première étape : préparation de la fraction nucléaire brute

– Anesthésie d'un rat (mis à jeun la veille). Le laisser saigner 1–2 min.

– Prélever le foie, le peser, le couper en petits morceaux avec une paire de ciseaux.

– Broyer au Potter (Potter de Thomas de 30 ml), 5 montées et descentes à 1 000 rpm en présence de STE (environ 10 ml par g de foie).

– Centrifuger à 600 g 10 min, à 4 °C, si possible dans un rotor pour centrifugation horizontale.

– Vider le surnageant. Remettre le culot en suspension à l'aide d'une baguette de verre. Diluer avec 30 ml de STE et re-centrifuger à 600 g pendant 10 min.

– Remettre en suspension au Potter (manuellement 1 à 2 montées et descentes) en présence de STE. Volume final de la fraction (environ 20 ml pour 1 foie) à noter Vcm^3.

Le culot constitue la fraction nucléaire brute. Cette fraction est utilisée sans autre purification pour l'extraction d'ADN.

3.2. Deuxième étape : extraction et purification de l'ADN

– Prélever 4 cm^3 de la préparation de noyaux et déposer cette prise dans un flacon de 250 cm^3 (avec bouchon hermétique).

– Ajouter 25 cm^3 de tampon TE.

– Ajouter 2 cm^3 de SDS.

– Bien mélanger.

– Chauffer le mélange à 60 °C pendant 10 min. Agiter de temps à autre.

– Ajouter $NaClO_4$ à 5 $mol.dm^{-3}$ en quantité telle que la concentration finale soit environ 1 $mol.dm^{-3}$ (6 cm^3 pour 25 cm^3 au départ).

– Ajouter 1 volume de chloroforme + alcool isoamylique (24 : 1, v/v). Fermer le flacon avec le bouchon et agiter le mélange énergiquement à la main pendant environ 5 min.

– Séparer les phases en centrifugeant à 1 000 g pendant 5 min à température ambiante. (Utiliser un (ou des) tube(s) à centrifuger en verre ou autre matériau résistant au chloroforme).

N B : équilibrer les pots avant la centrifugation.

– Prélever soigneusement la phase aqueuse (phase supérieure). Transvaser celle-ci dans le tube à centrifuger propre. Eviter de prélever les protéines coagulées à l'interface. Ré-extraire une nouvelle fois la phase aqueuse avec 1 volume de chloroforme + alcool isoamylique (24 : 1, v/v).

– Pendant la centrifugation, passer une baguette de verre à la flamme pour éliminer les nucléases. La poser dans un récipient propre (bécher de 250 cm^3). Ne pas toucher, l'extrémité de la baguette avec les doigts ; l'ADN étant très sensible à l'action des DNases.

– Prélever la phase aqueuse. Transvaser celle-ci dans une éprouvette de 50 cm^3. (Eviter de prélever les protéines coagulées à l'interface.) Après avoir noté le volume, transvaser la phase aqueuse dans le bécher de 250 cm^3.

– Ajouter *lentement* 2 volumes d'éthanol à 95 °C froid (– 20 °C) tout en agitant avec la baguette de verre (en tournant toujours dans le même sens). L'ADN précipite sous forme de filaments qui s'enroulent autour de la baguette de verre. Eliminer au maximum l'éthanol en pressant la baguette contre la paroi du récipient. Eponger *soigneusement* avec un morceau de papier Joseph.

– Déposer le produit récupéré dans une capsule préablement pesée (balance de précision). Sécher le précipité en le laissant dans un dessicateur.

– Peser le résidu après séchage (balance de précision, soit mg).

– Dissoudre l'ADN obtenu dans 5 cm^3 de tampon TE. La solubilisation est lente ; ne pas chauffer.

– Eventuellement, congeler une partie de cette solution plus en faire ultérieurement l'analyse électrophorétique.

REMARQUES :

• La basse température de l'éthanol est indispensable (le placer au préalable au congélateur).

• Pour gagner du temps on peut travailler en binôme, l'un fait la gravimétrie sur son essai et pèse jusqu'à masse constante alors que l'autre dissout l'ADN obtenu non sec dans 5 cm^3 de tampon TE sans faire de pesée.

• L'ADN étant très sensible à l'action des DNases omniprésentes, il faut veiller à la propreté rigoureuse de la verrerie et si possible travailler en atmosphère stérile (hotte à flux laminaire ou bec Bunsen).

3.3. Troisième étape : analyse de la solution d'ADN

3.3.1. Dosage de l'ADN par colorimétrie

Préparer une série de 7 tubes à essais, comme indiqué dans le *tableau 16.I.*

Tableau 16.I.

Tube	*ADN standard (ug)*	*Extrait (cm^3)*	*TCA (cm^3)*	*Réactif diphénylamine (cm^3)*
Blanc	0	0	2,00	4,00
1	200	0	1,50	4,00
2	400	0	1,00	4,00
3	600	0	0,50	4,00
4	800	0	0	4,00
Extrait	0	0,50	1,50	4,00
	0	1,00	1,00	4,00

N B : bien agiter les tubes, les boucher avec du papier aluminium et les mettre au bain-marie bouillant pendant 10 min. Les refroidir rapidement. Lire l'absorbance à 600 nm.

3.3.2. Caractérisation spectrale

– Diluer 2 fois la solution d'ADN dans le tampon TE.
– Enregistrer le spectre UV entre 230 et 320 nm.
– Noter les valeurs d'absorbance à 260 et 280 nm.

4. RÉSULTATS

4.1. Détermination de la masse

Indiquer la masse m en grammes d'ADN sec obtenu à partir de 4 cm^3 de la préparation de noyaux. Rapporter le résultat en volume d'extrait :

$$M = \frac{m \times V}{4} \text{ grammes}$$

4.2. Dosage colorimétrique de l'ADN

– A partir de la courbe d'étalonnage, exprimer la quantité x pg d'ADN par cm^3 d'extrait.

– Rapporter le résultat à la masse d'ADN purifié, soit x x 5.10^{-3}, $mg.g^{-1}$. Commenter le résultat.

4.3. Etude spectrophotométrique

– A partir de l'absorbance à 260 nm, calculer la concentration de l'extrait d'ADN. On précise que le coefficient d'absorption $E^{260} = 20\ dm^3\ cm^{-1}.g^{-1}$. Comparer ce résultat avec celui obtenu par colorimétrie.

– Exprimer le rapport $\frac{A_{260\ nm}}{A_{280\ nm}}$

Quelle indication supplémentaire donne ce rapport ? (Habituellement, ce rapport est compris entre 1,65 et 1,85.)

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Pourquoi l'association SDS-perchlorate de sodium favorise-t-elle l'extraction de l'ADN ?

Exercice n° 2 :

Comment évolue le rapport $\frac{A_{260\ nm}}{A_{280\ nm}}$ au cours des différentes étapes de purification d'un ADN de cellule eucaryote ?

Exercice n° 3 :

L'ADN extrait peut être caractérisé par son « point de fusion ». Proposer une méthode de détermination de ce « point de fusion ». Quel renseignement ce résultat donnerait-il ?

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

Dissociation des associations nucléoprotéiniques et précipitations des protéines, ce qui facilite l'extraction de l'ADN.

Exercice n° 2 :

Augmentation.

Exercice n° 3 :

– Placer une solution d'ADN dans la cuve d'un spectrophotomètre possédant un bloc thermostatique et enregistrer les variations d'absorbance à 260 nm en chauffant jusqu'à 90 °C environ.

– Permet de déterminer le pourcentage de G-C et éventuellement de vérifier si l'ADN utilisé est sous forme native.



TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES

SOMMAIRE

Le but de cette manipulation est :
- **de dégager les différents temps d'une analyse électrophorétique ;**
- **d'utiliser différents supports en fonction du problème analytique posé ;**
- **d'appliquer cette technique à des molécules biologiques diverses : acides aminés, protéines, acides nucléiques.**

Ces techniques trouvent leur place dans des manipulations plus complexes comme le suivi d'une purification de protéines (notamment d'enzyme) ou des manipulations touchant le génie génétique.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **mobilité électrophorétique ;**
- **électrophorèse de zone ;**
- **acétate de cellulose ;**
- **gel d'agarose ;**
- **tampon ;**
- **pHi ;**
- **ADN et enzymes de restriction ;**
- **carte de restriction.**

1. PRINCIPE

L'électrophorèse est une technique analytique basée sur la migration différentielle de molécules ionisées soumises à un champ électrique continu, dans un milieu électrolytique tamponné, de pH et de force ionique précise.

• Dans une première manipulation, on sépare des *petites molécules amphotères* sur un support simple comme le papier Whatman (acides aminés d'un jus de fruit par exemple) ; la migration se fera en fonction du pHi des molécules.

• Dans une deuxième manipulation, on se propose de séparer des protéines, soit des *macromolécules amphotères*. Pour éviter les phénomènes d'adsorption, donc des traînées, pour rendre le fond transparent et pour diminuer le temps d'analyse, on utilise l'acétate de cellulose comme support. La bande transparisée et séchée peut se prêter à une analyse densitométrique. Le critère essentiel de migration est le pHi des molécules.

• Dans une troisième manipulation, on utilisera davantage les propriétés du support. L'emploi d'un gel introduira le phénomène de tamisage des macromolécules. Les *acides nucléiques*, toujours chargés négativement et de même densité de charge, migrent vers l'anode et si la concentration du gel est judicieusement choisie, la distance de migration est inversement proportionnelle au logarithme de la masse molaire.

Cette technique peut être appliquée à l'établissement de cartes de restriction sur différents ADN.

Dans tous les cas, les différents temps de la manipulation sont identiques et peuvent être résumés dans la *figure 17.1*.

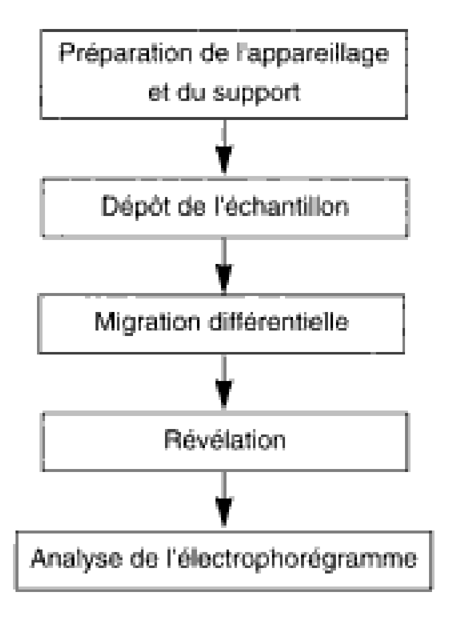


Fig. 17.1.

2. RÉACTIFS ET MATÉRIEL

- Générateur de courant stabilisé.
- Cuve à électrophorèse avec chevalet.
- Applicateur simple.

2.1. Manipulation (1)

- Bandes de papier Whatman n° 1.
- Pulvérisateur.
- Tampon pH 6,1 obtenu en mélangeant 15 cm^3 d'une solution de Na_2HPO_4 à 1/15 $mol.dm^{-3}$ avec 85 cm^3 d' une solution de KH_2PO_4 à 1/15 $mol.dm^{-3}$.
- Filtrat de jus de fruit (citron, orange).
- Mélange témoin d'acides aminés : acide aspartique + Proline + Arginine à 2 $g.dm^{-3}$ pour chaque acide aminé.
- Solution de révélation : ninhydrine à 2 $g.dm^{-3}$ dans le butanol. A conserver au réfrigérateur.

2.2. Manipulation (2)

- Bandes d'acétate de cellulose 17 x 2,5 cm (par exemple Cellogel fourni par Sebia).
- Tampon Véronal-Tris pH 9,2 à 0,04 $mol.dm^{-3}$ (μ = 0,05) : 10,30 g de véronal sodique + 1,84 g de véronal acide + 7,20 g de Tris pour 1 dm^3.
- Solution de lavage : acide acétique à 5 %.
- Solution de transparisation à préparer extemporanément : 85 cm^3 de méthanol + 15 cm^3 d'acide acétique + 0,5 cm^3 de glycérol.
- Colorant : rouge ponceau à 5 $g.dm^{-3}$ d'acide trichloracétique à 5 %.
- Appareil pour densimétrie.
- Echantillon : sérum bovin ou humain, éluat de chromatographie au cours d'une purification de protéine, extrait de viande, hémoglobine...

2.3. Manipulation (3)

- *Tampon Tris–Borate–EDTA : TBE*
  - Tris 90 mmol/L : 10,9 g ;
  - acide borique 90 mmol/L : 5,56 g ;
  - EDTA 2 mmol/L : 0,74 g ;
  - ajuster à pH = 8,3
  - eau distillée q s p : 1 dm^3.
- *Agarose très pur* en flacon pour pesée.
- *Bromure d'éthidium* à 5 mg/mL : dangereux. Pipeter avec Eppendorf et gants.
- *Solution de charge agarose :*
  - urée 4 mol/L : 2,4 g ;
  - saccharose 40 % : 4 g ;

– EDTA 50 mmol/L : 0,186 g ;
– bleu de bromophénol : 0,01 g ;
– H_2O stérile q s p : 10 ml.

• *Eau stérile.*

• *Tampon EcoR$_1$.*

• *Enzyme de restriction EcoR$_1$* : il est pratique d'utiliser l'enzyme et le tampon commercialisés par le même fournisseur. Les produits commercialisés par Bœhringer Manheim donnent toute satisfaction :
– tampon : Rifa Tampon H Bœhringer ;
– enzyme EcoR$_1$ réf. : 703737 Bœhringer ;
– incubation à 37 °C.

On conseille d'utiliser 10 U d'enzyme par µg d'ADN. Les volumes seront délivrés à l'aide d'une micropipette à cônes cristal.

• *Enzyme de restriction Hind 3* : mêmes remarques que pour l'enzyme EcoR$_1$. Exemples :
– tampon : réf. Bœhringer tampon B ;
– enzyme Hind III réf. : 656313 Bœhringer ;
– incubation à 37 °C.

On conseille d'utiliser 10 U d'enzyme par µg d'ADN. Les volumes seront délivrés à l'aide d'une micropipette à cônes cristal.

• *Substrat* : ADN de phage Lambda. Isolé à partir de E.coli. W. 3110.

• *Appareil à gel horizontal.*

• *Lampe UV.*

3. PROTOCOLE

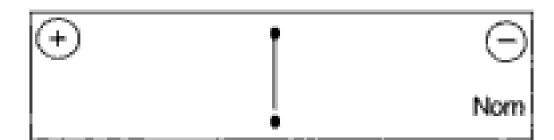
3.1. Première manipulation : séparation d'acides aminés par électrophorèse sur papier

3.1.1. Préparation de la cuve

• Remplir chaque compartiment d'un même volume de tampon. Bien essuyer la partie centrale de séparation pour éviter les court-circuits.

3.1.2. Préparation des bandes de papier

- Mise en place et dépôt de l'échantillon à analyser.
- Découper une bande de papier Whatman de 3 cm de largeur et de longueur adaptée à l'appareil. Eviter les traces de doigts.
- Identifier la ligne de dépôt et la polarité à l'aide d'un crayon graphite :



- Imprégner la bande dans le tampon.
- L'essorer rapidement avec une feuille de papier Joseph.
- L'installer sur le chevalet en vérifiant la polarité.
- Déposer 2 µl de la solution d'acides aminés à l'aide d'un applicateur en respectant le centrage du dépôt. On pourra faire deux dépôts : l'un avec le mélange témoin, l'autre avec le filtrat de jus de fruit analysé.
- Retendre les bandes avec précaution sans les déchirer.

3.1.3. Migration

- Introduire le chevalet dans la cuve.
- Relier la cuve au générateur.
- Régler la tension à environ 150 Volts. Vérifier l'intensité du courant. (Un courant trop important provoquerait un échauffement préjudiciable.)
- Laisser migrer environ 1 heure cuve fermée.
- En fin de migration, arrêter le générateur et déconnecter la cuve.

3.1.4. Révélation

- Sécher la bande avec un thermoventilateur.
- Faire une légère pulvérisation de ninhydrine et sécher à l'étuve à 100 °C.

3.2. Deuxième manipulation : séparation de protéines sur acétate de cellulose

Les détails du protocole expérimental seront à adapter au matériel, à la marque des bandes et au problème analytique posé. Dans la plupart des cas, les protéines seront placées en milieu basique et acquerront ainsi une charge globale négative qui les feront migrer de la cathode vers l'anode.

3.2.1. *Préparation des bandes*

Déposer les bandes sur une feuille de papier Joseph. Marquer ces bandes sur l'une de leurs extrémités qui sera le côté cathodique.

Lorsque les bandes présentent une face brillante et une face mate, c'est sur cette dernière que sera effectué le dépôt.

Chaque bande est ensuite imprégnée de solution tampon. Ce tampon a un pH égal à 8,6 et une force ionique de 0,05. Sa composition est variable mais il contient souvent du véronal acide (acide diéthylbarbiturique) et du véronal sodique.

Les bandes sont déposées à plat à la surface du tampon qui les imprègne progressivement par capillarité, ce qui permet de ne pas emprisonner de bulles d'air dans l'épaisseur de ces bandes. Dès qu'elles sont suffisamment imbibées de tampon, leur couleur passe au gris léger ; on peut alors les immerger à l'aide d'une baguette. Si des bulles y sont emprisonnées, elles forment des taches blanches : de telles bandes doivent être éliminées à moins que les bulles ne soient rares et petites, et disposées en dehors du parcours de la migration. Laisser les bandes immergées pendant au moins 15 min (il n'y a pas de délai maximal pour l'immersion des bandes).

Manipuler les bandes avec précaution, en utilisant des pinces de préférence.

3.2.2. *Mise en place des bandes*

L'essorage et la mise en place des bandes doivent être conduits rapidement car il ne faut pas sécher exagérément les bandes (essorage avec du papier Joseph qui se mouille rapidement sans éponger totalement le tampon des bandes).

Extraire les bandes du tampon où elles étaient immergées et les déposer sur le papier Joseph. Les presser régulièrement avec une autre feuille de papier Joseph, puis les placer sur leur support (chevalet), face mate vers le haut et repères du même côté. Les tendre suffisamment et veiller à ce que leurs extrémités soient bien appliquées contre le support.

3.2.3. *Dépôt du sérum*

Le dépôt est effectué à 2 cm du côté cathodique et à 4 mm des bords de la bande (pour éviter les effets de bord) lorsqu'il s'agit d'une bande de 2,5 cm de large.

Le dépôt peut être réalisé :
– soit à l'aide d'une micropipette par un mouvement de va-et-vient régulier (facilité en s'appuyant sur une règle posée en travers de la cuve). Le volume de la solution à déposer dépend de sa concentration. Pour le sérum, on dépose généralement 2 µl. Si la solution protéique est diluée, recommencer plusieurs fois le dépôt ;
– soit à l'aide d'un applicateur.

Introduire le chevalet dans la cuve et fermer celle-ci.

3.2.4. *Migration*

Connecter la cuve à l'alimentation stabilisée (le dépôt doit se trouver du côté cathodique). Régler la tension par exemple à 150 V et laisser migrer durant environ 2 h (ou 190 V pendant 1 h 30).

3.2.5. *Fixation, coloration et transparisation*

Les modes opératoires en sont nombreux et variés.

La fixation peut être réalisée par chauffage ou à l'aide d'un réactif dénaturant comme l'acide trichloracétique. La coloration ne doit s'exercer que sur les protéines et de la même façon quelle que soit la protéine (afin qu'il y ait proportionnalité entre les intensités de coloration et les concentrations protéiques).

Le colorant ne doit pas être élué par les lavages successifs. Les colorants les plus utilisés sont : le vert de lissamine, le noir amide ou amidoschwartz, le rouge ponceau S, etc.

Mode opératoire proposé :

- Sécher légèrement la bande.
- La colorer pendant 5 min dans un bain de rouge ponceau, face absorbante de la bande contre le colorant.
- Décolorer par 4 passages successifs dans une solution d'acide acétique à 5 % en renouvelant les bains.
- Immerger dans la solution de transparisation préparées extemporanément 3 à 5 min.
- Etendre la bande sur une plaque de verre très propre. A l'aide d'un agitateur, éliminer les bulles d'air.
- Placer quelques minutes à l'étuve à 60 °C.
- Laisser refroidir et détacher la bande.

3.2.6. *Analyse densitométrique de l'électrophorégramme*

- Utiliser si possible un densitomètre automatisé à lecture directe des pourcentages d'aire des différents pics. Conserver l'enregistrement.
- Si l'on souhaite un résultat en pourcentage massique, il est nécessaire de réaliser un dosage de protéines sur la solution analysée (voir chapitre 11).

3.3. Troisième manipulation : étude d'un ADN d'Eucaryote

On pourra utiliser l'ADN extrait (voir chapitre 15).

Pour des raisons matérielles, il n'est pas souvent possible de travailler stérilement dans la salle de travaux pratiques. Il est néanmoins nécessaire de travailler avec soin et attention. Les volumes à utiliser sont de l'ordre de quelques microlitres et par conséquent délicats à contrôler.

3.3.1. Digestion préalable des ADN par une enzyme de restriction $EcoR_1$

L'absence d'un des constituants du milieu réactionnel empêchera la coupure enzymatique.

Les produits d'hydrolyse de l'ADN du phage serviront de marqueurs.

- Numéroter 4 tubes Eppendorf de 1 à 4 et introduire successivement dans ces quatre tubes les volumes en microlitres indiqués dans le *tableau 17.I.*

Tableau 17.I.

Tubes n°	*1*	*2*	*3*	*4*
ADN	3	1	–	–
ADN d'Eucaryote	–	–	5	5
Tampon $EcoR_1$	2	–	2	–
$EcoR_1$	1	–	1	–
H_20	14	19	12	15
Volume final	20	20	20	20

- Mélanger en secouant le tube puis bien veiller à faire descendre tout le liquide au fond du tube.
- Conserver au froid les tubes 2 et 4.
- Incuber les tubes 1 et 3 à 37 °C pendant 1 heure en les plaçant sur un flotteur en polystyrène.

3.3.2. Analyse des fragments de restriction par électrophorèse en gel d'agarose

Appareillage

Les détails sur le mode opératoire seront à adapter au type d'appareillage.

L'électrophorèse est réalisée sur un appareil à gel horizontal sous immersion : disposer les peignes qui formeront les logettes de dépôt.

Le tampon d'électrophorèse TBE (tris, borate, EDTA)

Il présente l'avantage de posséder un pouvoir tampon très élevé, ce qui garantit le maintien du pH durant toute l'électrophorèse.

TBE :
- tris : 90 mmol/l ;
- acide borique : 90 mmol/l ;
- EDTA : 2 mmol/l ;
- pH : 8,3.

Préparation du gel d'agarose (1 gel pour 3 binômes)

- Dans un erlen de 250 cm^3 :

– introduire : 1,2 g d'agarose (0,8 % final) ; 150 cm^3 de TBE x 1 ; 1 barreau aimanté ;
– porter à ébullition sous agitation ;
– laisser refroidir dans un bain-marie à 45 °C et ajouter 15 µl de BET (Bromure d'éthidium, 5 mg/cm^3) pour obtenir une concentration finale en BET de 0,5 µg/cm^3.

Attention, le BET est un agent mutagène, il convient donc d'éviter tout contact direct avec la peau !

- Couler le gel et laisser refroidir pendant 30 min.

- Enlever délicatement les deux peignes et les rubans adhésifs.

- Remplir les cuves de l'appareil avec environ 1,5 litre de TBE contenant du BET (concentration finale 0,5 µg/cm^3). Recouvrir le gel de 1 à 2 mm de tampon. L'agarose, n'ayant pas une plus grande résistance que le tampon, conduira la majorité du courant électrique.

Préparation des échantillons

A la fin de l'incubation, ajouter à chaque échantillon 5 µl d'une solution d'urée 4 mol/dm^3, EDTA 50 mmol/dm^3, saccharose 40 %, bleu de bromophénol 0,1 %.

Dépôt des échantillons

Le dépôt des échantillons dans les logettes du gel se fait à l'aide d'une pipette automatique.

Introduire l'extrémité du cône dans la logette et délivrer doucement l'échantillon. Le saccharose ajouté en fin d'incubation lui confère une densité plus grande que celle du tampon d'électrophorèse. Le bleu de bromophénol permet de visualiser le dépôt puis la migration électrophorétique.

Migration électrophorétique

Déterminer la polarité du champ électrique et relier l'appareil à électrophorèse aux bornes du générateur. Afficher 1 heure et 300 volts.

3.3.3. Observation des résultats

La présence de BET dans le gel et dans le tampon permet de suivre la séparation des fragments d'ADN. Le BET colore l'ADN par intercalation. Sous irradiation ultraviolette, l'ADN coloré fluoresce dans le visible. Pour observer les résultats, placer l'appareil à électrophorèse dans la boîte à irradiation, brancher la lampe UV. Les ultraviolets de courtes longueurs d'onde sont dangereux pour les yeux, ne pas observer sans protection (utiliser une visière de protection).

Photographier le gel si possible.

4. ANALYSE DES RÉSULTATS

4.1. Séparation d'acides aminés

1) Analyser les résultats obtenus avec le mélange témoin et identifier les bandes d'après la position, la couleur et le pHi des acides aminés.

2) Cette expérience permet-elle d'identifier les acides aminés du jus de fruit étudiés ? Faire une analyse critique et comparer les résultats avec ceux obtenus par chromatographie sur couche mince.

4.2. Analyse d'une fraction protéique

Suivant le thème de la manipulation :
– repérer et identifier les différentes fractions ; analyser les pourcentages obtenus. S'il s'agit d'un sérum humain, conclure s'il peut être considéré comme pathologique ;
– conclure sur la pureté de la fraction étudiée (voir chapitre 30).

4.3. Electrophorèse d'ADN ou de fragments d'ADN sur gel d'agarose

1) Observer et schématiser la plaque de gel révélée ou la photographie.

2) Analyser les résultats obtenus avec les témoins.

3) Interpréter les résultats obtenus avec l'ADN d'Eucaryote digéré par $EcoR_1$. A partir du profil de restriction obtenu avec le phage (*fig. 17.2.*), trouver la droite d'étalonnage du gel. En déduire une estimation de la taille des fragments.

Données : nombre de paires de base (pb) des fragments de digestion du phage par $EcoR_1$.



Fig. 17.2. Carte de restriction de l'ADN de Lambda (1) $EcoR_1$

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Discuter les profils électrophorétiques obtenus à partir de sérum de malade (*fig. 17.3.*).

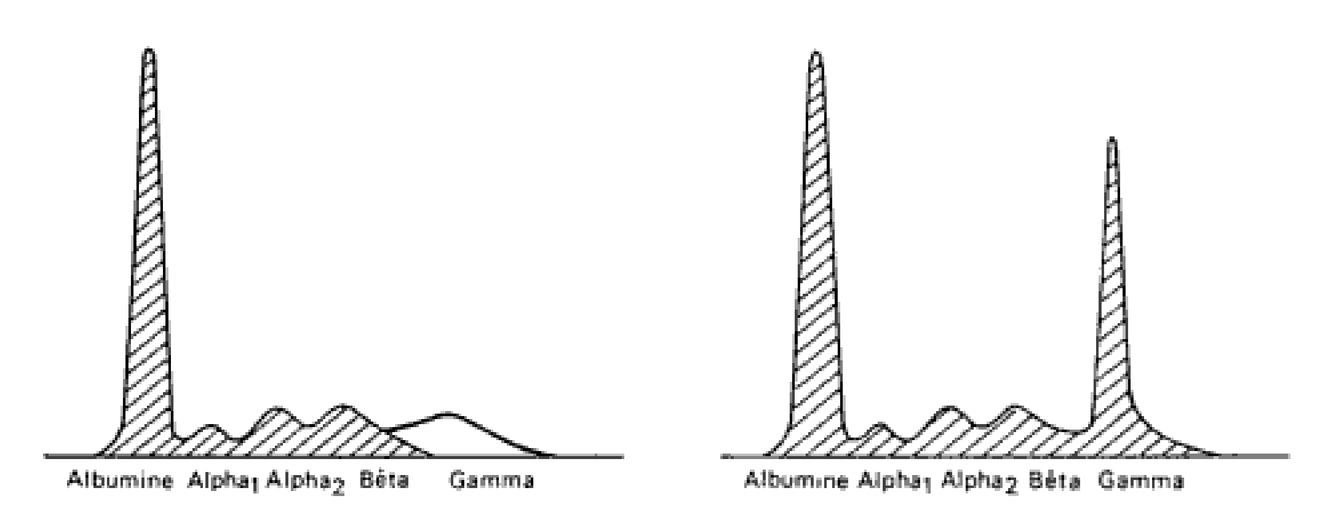


Fig. 17.3.

Exercice n° 2 :

Proposer une méthode de révélation spécifique des isoenzymes de la LDH après séparation électrophorétique.

Exercice n° 3 :

L'électrophorèse de protéines peut se faire sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) : préciser le principe de cette séparation et en discuter les avantages et les inconvénients.

Exercice n° 4 :

Quels sont les principaux facteurs intervenant en électrophorèse sur gel d'agarose ?

Exercice n° 5 :

L'électrophorèse capillaire :
- définition ;
- facteur influençant la mobilité d'un soluté.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

– Profil caractéristique d'une hypogamma globulinémie.
– Profil caractéristique d'une gammapathie monoclonale.

Exercice n° 2 :

– Incubation en présence de lactate, NAD^+ et de métasulfite de phénazine (PMS).
– Réoxydation du PMSH2, par un sel de tétrazolium qui est réduit en un dérivé insoluble et violet.

Lactate → pyruvate (LDH) ; NAD^+ → NADH, H^+ ; NADH, H^+ + PMS → NAD^+ + $PMSH_2$; $PMSH_2$ + Sel de tétrazolium → PMS + dérivé réduit violet

Exercice n° 3 :

Avantages :
– bon pouvoir de résolution ;
– sensibilité ;
– rapidité de mise en œuvre ;
– choix des conditions expérimentales (mailles du gel) ;
– application possible à la détermination de masse molaire et à l'étude des sous-unités ;
– couplage possible avec un transfert (Westernblot).

Inconvénients :
– analyse de protéines sous forme dénaturée ;
– dissociation des chaînes ;
– utilisation possible uniquement en technique analytique.

Exercice n° 4 :

La migration d'un acide nucléique sur gel d'agarose dépend :
– de la maille du gel par rapport à la taille de la molécule ;
– de la conformation de la molécule ;
– de la tension du courant ;
– de la température.

La migration d'une protéine dépend :
– de la charge ;
– de la tension du courant ;
– des forces d'électroendosmose.

Exercice n° 5 :

Facteurs importants en électrophorèse capillaire :
– charge ;
– volume hydrodynamique ;
– électroendosmose, le flux électroosmotique dépend du pH et du potentiel.



ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE DU SACCHAROSE PAR LA ß-FRUCTOSIDASE

SOMMAIRE

PAGE

Le but de cette manipulation est de décrire une technique colorimétrique de mesure de l'apparition du produit formé en fonction du temps, afin de visualiser la cinétique de la réaction.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **enzyme ;**
- **vitesse de réaction ;**
- **ordre de réaction ;**
- **hydrolyse ;**
- **liaison αet ß osidiques ;**
- **diholoside ;**
- **cinétique ;**
- **substrat, tampon, produit de réaction.**

La ß-fructosidase est une hydrolase, extraite de la levure Saccharomyces, capable de scinder les liaisons ß fructofurannosiques (EC 3.2.1.26).

Elle catalyse la transformation du saccharose, diholoside non réducteur dextrogyre en un mélange équimoléculaire de glucose et de fructose, lévogyre, également nommé sucre inverti. Cette propriété justifie le nom d'invertase que l'on donne parfois à la ß-fructosidase.

La réaction catalysée est :

CH₂OH, O, OH, HO, OH, O, HOH₂C, O, HO, CH₂OH, HO — $+ H_2O \longrightarrow$ — CH₂OH, O OH, OH, HO, OH — + — HOH₂C, O, OH, HO, CH₂OH, HO

saccharose (substrat)

glucose ⟵⟶ fructose

produits = sucre inverti

1. PRINCIPE

1.1. La vitesse initiale de la réaction

La formation du produit en fonction du temps donne pour toute réaction chimique déclenchée par l'apport des différents réactifs, une courbe comme celle de la *figure 18.1.*

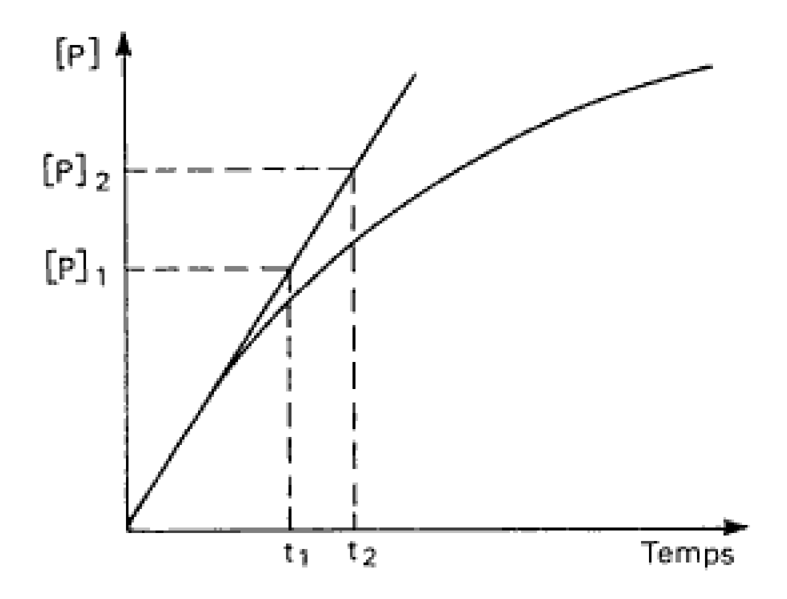


Fig. 18.1. Courbe [P] = f (t)

La vitesse de la réaction au temps t correspond à la pente de la courbe en ce point.

La vitesse peut être constante en début de réaction : mais ensuite, au fur et à mesure que la réaction avance, la vitesse décroît en même temps que la concentration des réactifs, pour finalement devenir nulle. C'est la fin de la réaction : tous les réactifs ont été transformés en produits (réaction totale) ou, ce qui est le cas le plus fréquent, la réaction a atteint un équilibre (égalité des vitesses dans les deux sens).

La vitesse initiale (Vi) est la vitesse de la réaction au temps t = 0. Elle peut être déterminée graphiquement en traçant une tangente à la courbe :

$$V_i = \frac{[P_2] - [P_1]}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta [P]}{\Delta t}$$

(Le terme de « concentration » est couramment utilisé à la place de celui d'« activité » pour des concentrations faibles en réactifs).

Dans les conditions de Vi (vitesse initiale au temps t = 0), il n'y a pas (ou très peu) de produits formés et donc la réaction en sens inverse n'intervient pas.

La vitesse initiale dépend des concentrations initiales en réactifs *(fig. 18.2.)*.

Soit une réaction : A + B → C + D
avec à t = 0 $[A_0] + [B_0]$

Si $[B_0] >> [A_0]$ de sorte que $[B_0]$ reste constant :
- la vitesse initiale sera d'ordre 0 si $Vi = k \cdot [A_0]^0 \cdot [B_0]^0 = k$ (k = constante de vitesse) ;
- la vitesse initiale sera d'ordre 1 si $Vi = k \cdot [A_0]^1 \cdot [B_0]^0 = k \cdot [A_0]$;
- la vitesse initiale sera d'ordre 2 si $Vi = k \cdot [A_0]^2 \cdot [B_0]^0 = k [A_0]^2$.

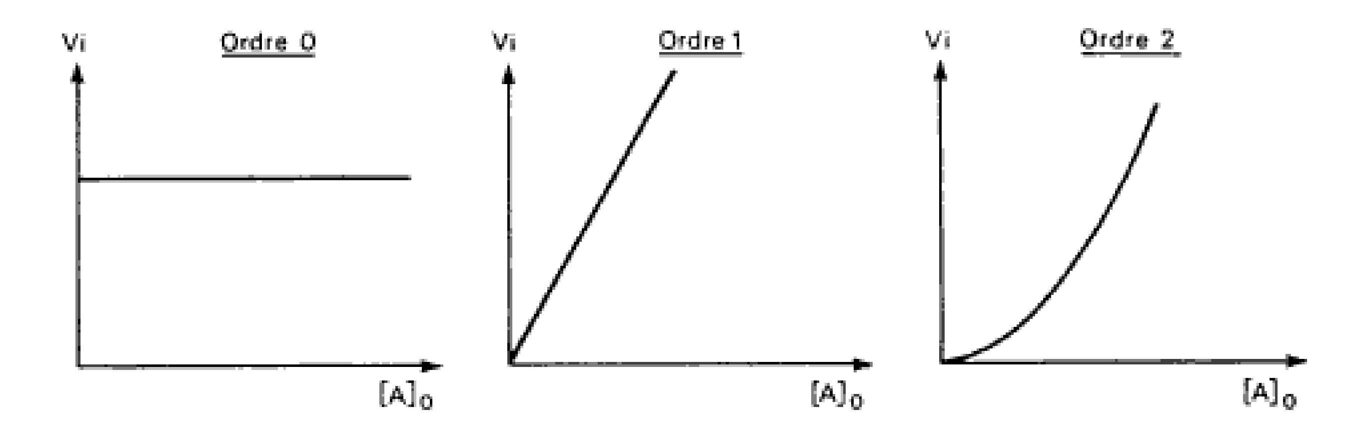


Fig. 18.2. Ordres de réaction pour Vi en fonction de la concentration initiale en réactifs

La vitesse de l'hydrolyse acide du saccharose est proportionnelle à la concentration en saccharose, pour une concentration élevée et constante en acide : la réaction chimique est d'ordre 1 par rapport au saccharose.

En présence de ß-fructosidase (ou invertase), les résultats expérimentaux montrent que la réaction d'hydrolyse enzymatique du saccharose est :
- d'ordre 1 pour les faibles concentrations en saccharose ($Vi = k\ [\text{saccharose}]_{\text{initiale}}$) ;
- d'ordre 0 pour des concentrations plus fortes en substrat.

La courbe $Vi = f([\text{saccharose}]_{\text{initiale}})$ pour une concentration constante en ß-fructosidase est une branche d'hyperbole équilatère *(fig. 18.3.)*.

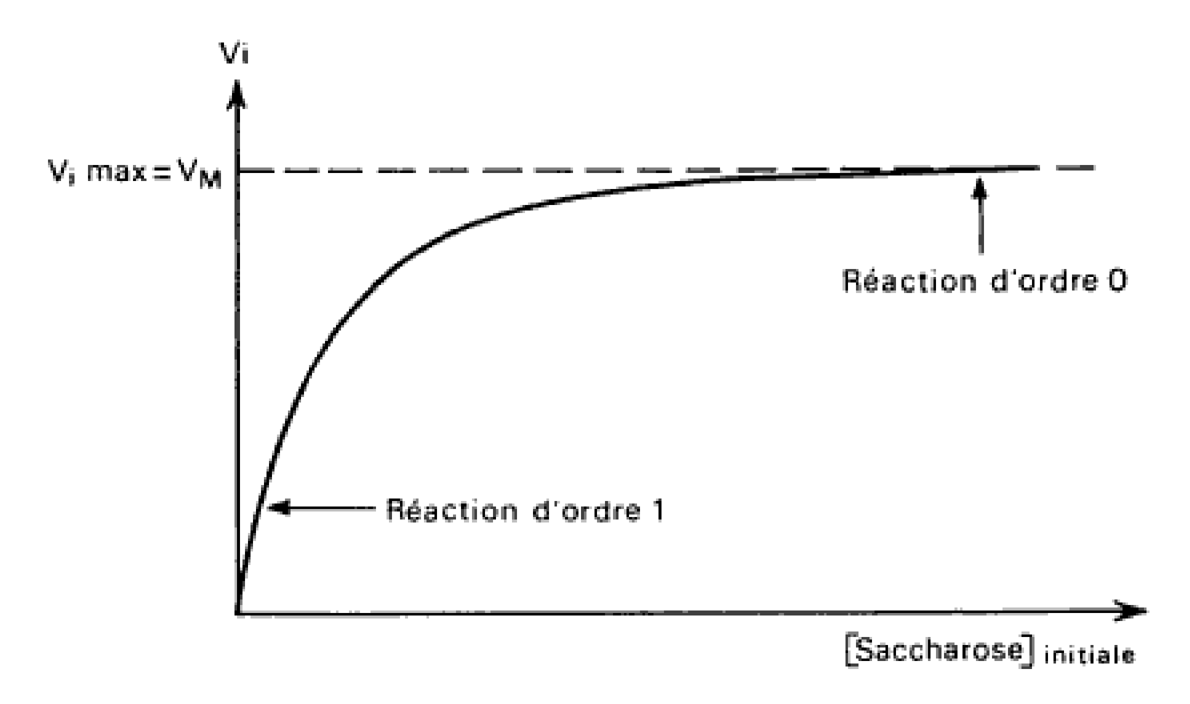


Fig. 18.3. Courbe Vi = f (s)$_0$

1.2. Méthode de mesure de la vitesse de réaction

L'hydrolyse enzymatique du saccharose est réalisée en milieu tampon acéto-acétique pH 4,7.
La courbe [P] = f(t) est une droite dans les conditions de vitesse initiale (Vi).

La méthode de mesure utilisée est une méthode « 2 points ».
La vitesse de la réaction est déterminée par la mesure des produits formés en fonction du temps, après une réaction complémentaire de coloration.
Il s'agit de mesurer la quantité de produit apparu au bout d'un temps donné dans un milieu réactionnel contenant le tampon (T), le substrat (S) et l'enzyme (E).
La mesure du temps démarre à l'instant précis où le milieu réactionnel est complet : (T + S + E).

Le milieu réactionnel est caractérisé par :
- le volume total (V cm^3) ;
- la concentration en saccharose : [S] (en $mol.dm^{-3}$) ;
- la quantité d'enzyme (E) présente dans ce milieu réactionnel exprimée : soit en unités de volume, soit en masse d'enzyme, en mol d'enzyme ou en UI ou katal d'enzyme.

• **Tube zéro** *(fig. 18.5.)*

Pour la réaction du tube 0, on préincubera uniquement le tampon et le substrat.
On ajoute le 3,5 DNS au temps zéro.
L'enzyme est ajoutée ensuite dans le milieu dénaturant.

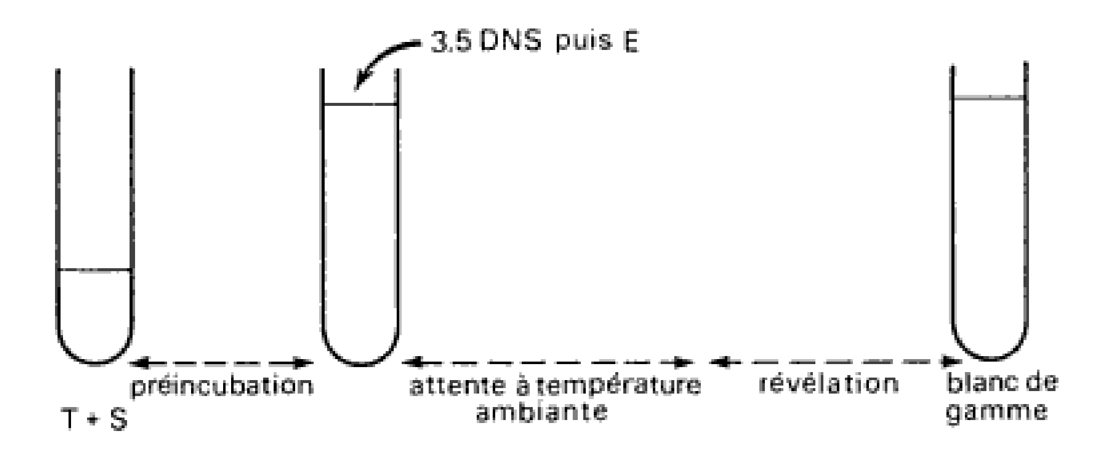


Fig. 18.5. Schématisation de la séquence opératoire pour le tube témoin « zéro »

L'enzyme est dénaturée dès son introduction dans le tube « zéro » par l'acide 3,5 – dinitrosalicylique.

On déterminera la quantité de sucre inverti apparu par comparaison à une droite d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions.

2. RÉACTIFS

• *Solution d'enzyme* (enzyme Merck à 200 U/mg) à 0,2 mg.cm^{-3} dans un tampon phosphate 0,025 mol.dm^{-3}, pH = 7.

• *Solution étalon à 0,01 mol.dm^{-3} de sucre inverti :*
Solution mélange :
– glucose à 0,005 mol.dm^{-3} (0,9 g.dm^{-3}) ;
– fructose à 0,005 mol.dm^{-3} (0,9 g.dm^{-3}).
A préparer au dernier moment et à conserver au froid (+ 4 °C).

• *Solution mère étalon de saccharose à 0,6 mol.dm^{-3} :*
Saccharose : 205,2 g.dm^{-3}.
A dissoudre dans de l'eau distillée bouillie froide.
A conserver à + 4 °C.

- *Réactif de coloration au DNS :*
- acide 2 hydroxy 3,5 – dinitrobenzoïque : 9,84 g ;
- hydroxyde de sodium en lessive : 40 cm^3 ;
- tartrate double de sodium et de potassium : 300 g ;
- H_2O q s p : 1 000 cm^3.

- *Tampon acéto-acétique, 0,1 $mol.dm^{-3}$, pH 4,7 :*
- acétate de sodium : 8,2 $g.dm^{-3}$ (≈ 0,1 $mol.dm^{-3}$) ;
- acide acétique pur pour analyses : 5,8 cm^3 par dm^3.

- *Tampon phosphate 0,025 $mol.dm^{-3}$, pH 7.*
- *acide citrique : 0,1 $mol.dm^{-3}$.*
- *Na_2HPO_4 : 0,2 $mol.dm^{-3}$.*

- *Solution étalon de pH : solution saturée d'hydrogénotartrate de potassium : pH 3,57 à 20 °C*

Introduire environ 9 g d'hydrogénotartrate de potassium pur, cristallisé, séché auparavant 2 heures à 110 °C, dans environ 250 cm^3 d'eau tiédie à 40 °C et contenus dans un flacon à bouchon rodé étiqueté. Filtrer si nécessaire, pour éliminer le sel en suspension. Puis laisser refroidir la solution à 20 °C en la laissant reposer 2 heures.
(L'addition d'un cristal de thymol (≈ 0,1 g) augmente la durée de conservation de la solution tampon).

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Etalonnage de l'appareil

Réaliser la gamme d'étalonnage en se conformant au *tableau 18.I.*

Tableau 18.I.

N° tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Solution mélange de glucose à 0,005 $mol.dm^{-3}$ et de fructose à 0,005 $mol.dm^{-3}$ (cm^3)	0	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25
Eau bidistillée (cm^3)	2	1,75	1,50	1,25	1,00	0,75
Tampon acétate à pH 4,7 (cm^3)	1	1	1	1	1	1
Solution de saccharose à 0,6 $mol.dm^{-3}$ (cm^3)	1	1	1	1	1	1
Réactif à l'acide 3,5–dinitrosalycilique (cm^3)	2	2	2	2	2	2
Absorbances mesurées à λ = 530 ou 495 nm						

3.2.3. Lectures

Lire les absorbances des tubes de mesure à 530 nm (ou 495 nm) contre le témoin zéro, en utilisant le même appareil que pour la lecture de la gamme d'étalonnage.

3.2.4. Questions

1) Tracer la courbe d'étalonnage représentant la variation de l'absorbance en fonction du nombre de micromoles d'hexoses par tube.

2) Donner sous forme de tableau la réalisation des tubes de mesure et du tube témoin zéro.

3) Tracer la courbe A = f (temps d'incubation).

4) Déterminer sur la gamme d'étalonnage le nombre de µmoles d'hexoses libérés par minute.

5) Sachant que l'unité ß fructosidasique est la quantité de ß fructosidase nécessaire pour hydrolyser 1 µmole de saccharose en 1 minute à 25 °C et à pH 4,7, calculer l'activité spécifique de l'enzyme en unités par milligramme.

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. Gamme d'étalonnage *(tabl. 18.II.)*

Tableau 18.II.

Hexoses qs en µmol	0	2,5	5	7,5	10	12,5

4.2. Tableau de réalisation des essais *(tabl. 18.III.)*

Tableau 18.III.

N° tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*
Tampon acéto-acétate (cm^3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Saccharose à 0,6 $mol.dm^{-3}$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Réactif au 3-5 DNS (cm^3)	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ß fructosidase (cm^3) addition au temps t =	1 –	1 0	1 2 min	1 3 min	1 5 min	1 7 min	1 8 min	1 10 min	1 11 min	1 13 min
Réactif au 3,5 – DNS (cm^3) Addition au temps t =	–	2 1 min	2 4 min	2 6 min	2 9 min	2 12 min	2 14 min	2 17 min	2 19 min	2 22 min
Temps d'incubation (min)		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A à λ = 530 ou 495 nm	0									

4.3. Activité de la solution enzymatique

$\Delta A / \Delta t$ = pente de la droite A = f (t) dans les conditions de Vi (partie linéaire en début du tracé graphique).

Par référence à la courbe d'étalonnage : $\Delta A / \Delta t$ = X µmol d'hexoses libérés / Δt

Activité de la solution enzymatique en unités par mg (Δt en minute) :

$$n_{saccharose} = 1/2\ n_{hexoses} = \frac{X}{\Delta t} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{0,2} = \frac{X}{\Delta t} \times \frac{1}{0,4} = 2,5 \times \frac{X}{\Delta t}$$

5. EXERCICE

Etude de l'activité d'une préparation d'amylase (d'après sujet de CAPET).

5.1. Mode opératoire

L'amylase est une enzyme extraite du germe de blé par l'alcool absolu et remise en solution en milieu tamponné. Elle catalyse l'hydrolyse des liaisons 1-4 de l'amidon avec production de sucres réducteurs.

La réaction peut être suivie par action des sucres réducteurs apparus sur l'acide 3,5-dinitrosalicylique réduit en acide 3-aminonitrosalycilique dont l'absorbance est mesurée à 520 nm.

Etalonnage de l'appareil par une soution de maltose

Préparer, à partir d'une solution mère de maltose à 100 $g.dm^{-3}$, une gamme contenant de 0 à 5 mg de maltose par tube. Après addition du réactif au DNS dans tous les tubes, les porter 5 minutes au bain bouillant ; refroidir dans la glace. Ajouter 15 cm^3 d'eau distillée. Lire l'absorbance à 520 nm.

Témoin réactif :
- 3 cm^3 d'eau distillée ;
- 1 cm^3 de tampon acétate (pH = 4,8) ;
- 2 cm^3 de réactif DNS.

Résultats expérimentaux *(tabl. 18.IV. et 18.V.)*

Tableau 18.IV. : résultats (1)

Temps d'incubation (min.)	*2*	*4*	*6*	*8*	*10*	*15*	*20*	*25*	*30*	*40*
A à 520 nm	0,286	0,570	0,849	1,050	1,150	1,241	1,280	1,300	1,320	1,324

Tableau 18.V. : résultats (2)

Maltose (qm) mg	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
A à 520 nm	0,312	0,630	0,948	1,262	1,570

5.2. Questions

1) Donner un tableau de composition des tubes de mesure et du tube témoin ainsi qu'un protocole opératoire pour la mesure de l'activité de l'amylase *(tabl. 18.VI.)*.

Hydrolyse de l'amidon : 2,5 cm^3 d'amidon
1 cm^3 de tampon phosphate pH7
0,5 cm^3 d'amylase

2) Donner le tableau de composition des tubes pour l'étalonnage par une solution de maltose *(tabl. 18.VII.)*.

3) Sachant que l'unité d'activité amylasique (U_{amy}) est la quantité d'enzyme capable de libérer 1 mg de maltose par heure d'incubation, calculer l'activité enzymatique de la préparation en U_{amy} /cm^3 d'extrait puis en unités du système international.

CORRECTION DE L'EXERCICE

1) Tableau 18.VI.

N° tubes	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*
Amidon (cm^3)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Solution tampon phosphate (cm^3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bain thermostaté 30 °C pendant 5 min.											
H_2O (cm^3)	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Solution d'amylase (cm^3) addition à t = (m : min.)	0	0,5 0 m	0,5 30 s	0,5 1 m	0,5 1m30s	0,5 3m	0,5 3m30s	0,5 4m	0,5 4m30s	0,5 5m	0,5 5m30s
3,5-DNS (cm^3) addition à t = (m : min.)	2 –	2 2m	2 4m30s	2 7m	2 9m30s	2 13m	2 18m30s	2 24m	2 29m30s	2 35m	2 45m30s
H_2O (cm^3)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Temps d'incubation (min.)	–	2	4	6	8	10	15	20	25	30	40

2) Tableau 18.VII. : Gamme d'étalonnage

N° tubes	$T_{réactif}$	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Maltose qm en mg	0	1	2	3	4	5
Maltose (cm^3)	0	0,5	1	1,5	2	2,5
H_2O (cm^3)	3	2,5	2	1,5	1	0,5
Tampon acétaté (cm^3)	1	1	1	1	1	1
Réactif 3.5-DNS (cm^3)	2	2	2	2	2	2
H_2O (cm^3)	15	15	15	15	15	15

Solution étalon de maltose nécessaire pour préparer les tubes de gamme : 2 $mg.cm^{-3}$, soit 2 $g.dm^{-3}$; le coefficient de dilution de la solution mère est = 2/100 ou 1/50.

3)

Courbe $A_{520\ nm} = f\,(t_{incubation})$.

La Vi = pente de la tangente à la courbe, à l'origine = $\Delta A/\Delta t = 0{,}142\ \Delta A\ min^{-1}$.

Par référence à la courbe d'étalonnage : $\Delta A / \Delta t = 0{,}142\ \Delta A\ min^{-1}$ correspond à 0,46 mg de maltose libérés en une minute ;

- activité de l'amylase : 0,46 x 2 x 60 = 55,2 unités d'activité ;
- activité en $UI/cm^3 = \dfrac{0{,}46 \times 10^{-3}}{342} \times 10^{6} \times 2 = 2{,}69$;
- activité en $katal/dm^3 = \dfrac{0{,}46 \times 10^{-3}}{342} \times \dfrac{1}{60} \times 2 \times 10^{3} = 4{,}5 \times 10^{-5}$.

Le but de la manipulation est de doser les ions sodium et potassium :
- **soit dans un produit alimentaire : eau destinée à la consommation, lait ;**
- **soit dans un produit biologique : sérum, urine.**

1. PRINCIPE

Lorsque des éléments à bas potentiel d'excitation (cations alcalins Li^+, Na^+, K^+ et alcalino-terreux Ca^{2+}, Mg^{2+}) sont excités par la température élevée d'une flamme, ils émettent un spectre de radiations caractéristique.

Le rayonnement lumineux est traité par un système dispersif de sélection des radiations (filtre optique ou monochromateur) puis analysé sur un récepteur (photomultiplicateur, cellule photoélectrique) permettant ensuite une mesure (*fig. 19.1.*).

Pour une longueur d'onde donnée, l'intensité de l'émission est une fonction de la concentration du cation dosé (*fig. 19.2.*).

Pour des raisons de sensibilité, la spectrophotométrie d'émission convient essentiellement au dosage des alcalins Li^+, Na^+ et K^+.

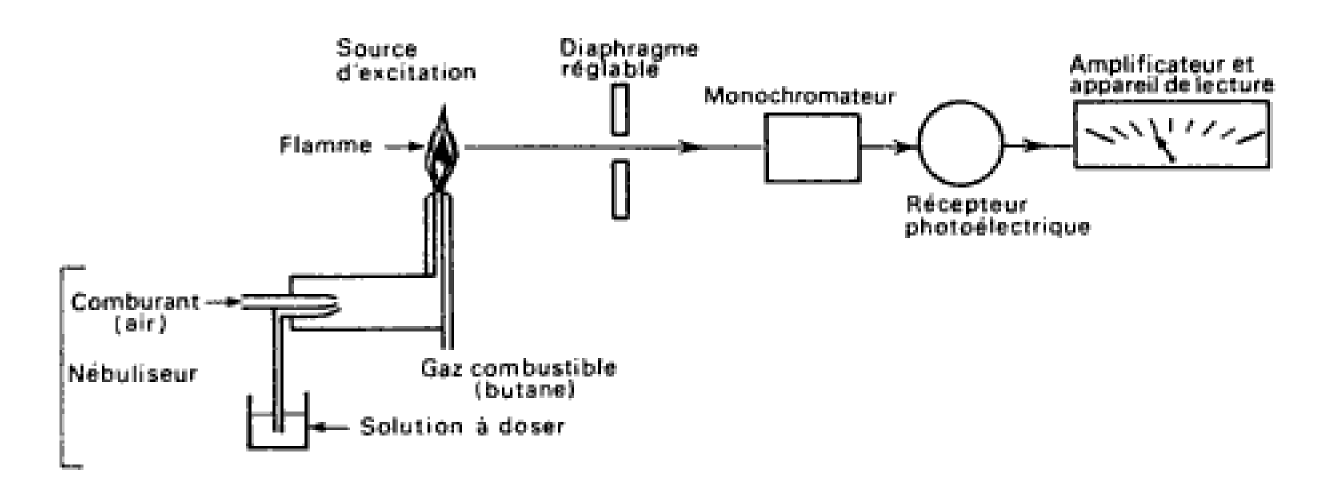


Fig. 19.1. Schéma de principe d'un spectrophotomètre d'émission de flamme

1.2. Précautions opératoires

1) Réaliser les dilutions, le rinçage et le réglage du 0 de l'appareil avec la même eau bidistillée ou déminéralisée.

2) Les réactifs sont à préparer et à conserver dans des flacons très propres, à bouchage étanche (flacons de polyéthylène à bouchons vissés) afin d'éviter les échanges ioniques avec les parois des flacons ou avec les bouchons.

3) L'intensité des rayonnements émis par l'ion à doser peut être augmentée ou diminuée par la présence d'autres molécules : anions, cations, substances minérales ou organiques présents dans la solution pulvérisée.

Par exemple : le dosage des ions Na^+ dans un extrait cellulaire est influencé par les ions K^+, présents en grande quantité. De même, il y a une interaction des ions Na^+ lors du dosage des ions K^+ du plasma.

En général, les interactions des molécules ou des ions qui gênent le dosage d'un cation, sont fonction de leur concentration absolue et de leur concentration relative par rapport au cation dosé.

Pour compenser ces interactions, on utilise :
– soit des solutions étalons mixtes où la concentration absolue de la molécule ou de l'ion perturbateur est voisine de celle qu'il a dans la solution à doser ;
– soit des solutions étalons mixtes ayant un rapport de la concentration de la molécule ou de l'ion perturbateur à la concentration du cation à doser, constant.

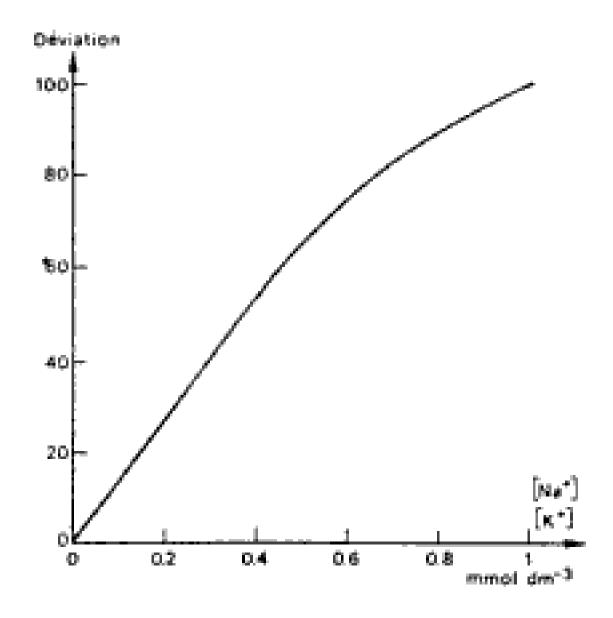


Fig. 19.3. Courbe d'étalonnage

Dosage du sodium et du potassium d'une eau de consommation

1. RÉACTIFS

- *Solution étalon de sodium à 0,5 g.dm $^{-3}$* :

– chlorure de sodium pur et anhydre (58,45 g.mol $^{-1}$) desséché au préalable pendant 2 heures à 140 °C, puis chauffé à 500 °C : 1,272 g ;
– eau bidistillée q s p : 1 000 cm^3.

- *Solution étalon de potassium à 0,5 g.dm $^{-3}$* :

– chlorure de potassium pur et anhydre (74,6 g.mol $^{-1}$) desséché au préalable pendant 2 heures à 100-130 °C : 0,955 g ;
– eau bidistillée q s p : 1 000 cm^3.

- *Eau à analyser* (eau minérale, eau d'un puits, eau du robinet).

2. MODE OPÉRATOIRE

2.1. Dosage du sodium

Dans des fioles jaugées de 100 cm^3, préparer des solutions étalons comprises entre 0 et 20 mg de sodium par dm^3.

Homogénéiser les fioles jaugées, puis effectuer les lectures à la longueur d'onde de 589 nm (filtre Na^+) après avoir réglé le spectrophotomètre de flamme.

2.2. Dosage du potassium

Procéder comme pour le sodium, en utilisant la solution étalon de K^+ à 0,5 g.dm $^{-3}$ et en effectuant les lectures à la longueur d'onde de 767 nm (filtre K^+).

2.3. Analyse de l'eau

Effectuer les dosages du sodium et du potassium de l'eau à analyser, éventuellement diluée.

3. RÉSULTATS

1) Tracer les courbes d'étalonnage ou utiliser la régression linéaire.

2) Calculer les teneurs en sodium et potassium de l'eau analysée, exprimées en $mg.dm^{-3}$.

Données : limites de qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Les valeurs des concentrations doivent être inférieures ou égales à (décret n° 89-3 du 3 janvier 1989) :
– sodium : 150 $mg.dm^{-3}$;
– potassium : 12 $mg.dm^{-3}$.

4. TECHNIQUE

4.1. Composition des fioles jaugées *(tabl. 19.I.)*

Tableau 19.I.

N° des fioles	*T*	*1*	*2*	*3*	*4*	*Dosage*
Sodium ou potassium ($mg.dm^{-3}$)	0	5	10	15	20	x_{Na^+} x_{K^+}
Coefficient de dilution	–	$\frac{5}{500}$	$\frac{10}{500}$	$\frac{15}{500}$	$\frac{20}{500}$	–
Echantillon à analyser (cm^3)	–	–	–	–	–	100
Solution étalon de sodium ou de potassium à 0,5 $g.dm^{-3}$	0	1	2	3	4	–
Eau bidistillée (cm^3)	100	99	98	97	96	–

4.2. Calculs

Pour une eau non diluée :
– teneur en sodium = x_{Na^+} mg. dm^{-3} ;
– teneur en potassium = x_{K^+} mg.dm^{-3}.

x_{Na^+} et x_{K^+} étant les concentrations massiques en Na^+ et K^+ obtenues expérimentalement (courbe d'étalonnage).

Dosage du sodium et du potassium d'un lait

Le dosage est réalisé sur le surnageant d'un lait coagulé par l'acide acétique car les caséines interfèrent sur le dosage.

1. RÉACTIFS

• *NaCl pur pour analyses et anhydre* (masse molaire : 58,45 g.mol^{-1}) desséché au préalable pendant 2 heures à 140 °C, puis chauffé à 500 °C.

• *KCl pur pour analyses et anhydre* (masse molaire : 74,6 g.mol^{-1}) desséché au préalable pendant 2 heures à 110-130 °C.

• *Lait à analyser.*

2. MODE OPÉRATOIRE

2.1. Préparation d'une solution étalon mixte

Préparer 100 cm^3 d'une solution étalon mixte renfermant 0,500 $g.dm^{-3}$ de sodium et 1,500 $g.dm^{-3}$ de potassium.

2.2. Etalonnage de l'appareil

- *Gamme étalon en sodium*

Préparer une gamme de six solutions étalons, en fioles jaugées de 100 cm^3, dont les concentrations en sodium seront comprises entre 0,005 $g.dm^{-3}$ et 0,030 $g.dm^{-3}$.

Passer ces solutions au photomètre de flamme.

- *Gamme en potassium*

Préparer une gamme de cinq solutions étalons, en fioles jaugées de 100 cm^3 dont les concentrations en potassium seront comprises entre 0,0015 $g.dm^{-3}$ et 0,075 $g.dm^{-3}$.

Passer ces solutions au photomètre de flamme.

2.3. Dosage du lait

- *Défécation* : à 50 cm^3 de lait, ajouter de l'acide acétique cristallisable jusqu'à l'obtention du pH = 4,6 (vérification au pHmètre). Transvaser quantitativement dans une fiole jaugée et ajuster à 100 cm^3. Agiter puis filtrer (sur filtres sans cendres).
- *Dosage du sodium* : faire le dosage sur le filtrat de défécation dilué au 1/10.
- *Dosage du potassium* : faire le dosage sur le filtrat de défécation dilué au 1/200.

3. RÉSULTATS

1) Tracer les courbes d'étalonnage ou utiliser la régression linéaire.

2) Calculer les concentrations massiques du sodium et du potassium du lait analysé, exprimées en $g.dm^{-3}$.

4.3. Calculs

- Concentration massique en sodium = $20.x_{Na^+}$ $g.dm^{-3}$.
- Concentration massique en potassium = $400.x_{K^+}$ $g.dm^{-3}$.

x_{Na^+} et x_{K^+} étant les concentrations massiques dans le filtrat de défécation dilué, obtenues expérimentalement (courbe d'étalonnage *fig. 19.3.*).

Dosage du sodium et du potassium sériques

Le dosage est effectué, sans défécation préalable, sur le sérum (le sang du patient est recueilli dans des tubes avec granules séparateurs) ou sur le plasma (le sang du patient est recueilli sur anticoagulant : héparinate de lithium).

La moindre hémolyse perturbe le dosage du sodium (résultat par défaut) et interdit celui de potassium (résultat par excès).

Consignes de sécurité à respecter pour la manipulation de sérum humain (cf. chapitre 11 § 3).

1. RÉACTIFS

- *NaCl pur et anhydre R P pour pesée* (masse molaire : 58,45 $g.mol^{-1}$) desséché au préalable pendant 2 heures à 140 °C, puis chauffé à 500 °C.
- *KCl pur et anhydre* (masse molaire : 74,6 $g.mol^{-1}$) desséché au préalable pendant 2 heures à 110-130 °C.
- *Sérum à analyser* (sérum animal : sérum de bœuf).

2. MODE OPÉRATOIRE

2.1. Préparation des solutions étalons

Préparer par pesée de chlorure de sodium pur et anhydre, une solution étalon mère de Na^+ à 2,338 g de NaCl par dm^3.

Préparer par pesées de chlorure de sodium et de chlorure de potassium purs et anhydres, une solution étalon mère de K^+ à 0,746 g de KCl et 20,45 g de NaCl par dm^3.

2.2. Etalonnage de l'appareil

Préparer une gamme de solutions étalons, en fioles jaugées de 100 cm^3, dont les concentrations molaires sont comprises entre :
- 0,2 et 1 mmol par dm^3 pour le dosage des ions sodium ;
- 0,1 et 0,5 mmol par dm^3 pour le dosage des ions potassium.

2.3. Dilutions du plasma

Diluer le plasma de façon convenable avant de le passer dans le photomètre de flamme pour le dosage des ions Na^+ et K^+.

3. RÉSULTATS

1) Tracer les courbes d'étalonnage ou utiliser la régression linéaire.

2) Calculer les concentrations molaires du Na^+ et du K^+ plasmatiques exprimées en $mmol.dm^{-3}$.

Données :
- Pl, Se – Sodium-(substc) = 140 ± 6 $mmol.dm^{-3}$;
- Pl, Se – Potassium-(substc) = 4,2 ± 0,6 $mmol.dm^{-3}$;
- Na = 23 $g.mol^{-1}$; Cl = 35,45 $g.mol^{-1}$; K = 39,1 $g.mol^{-1}$.

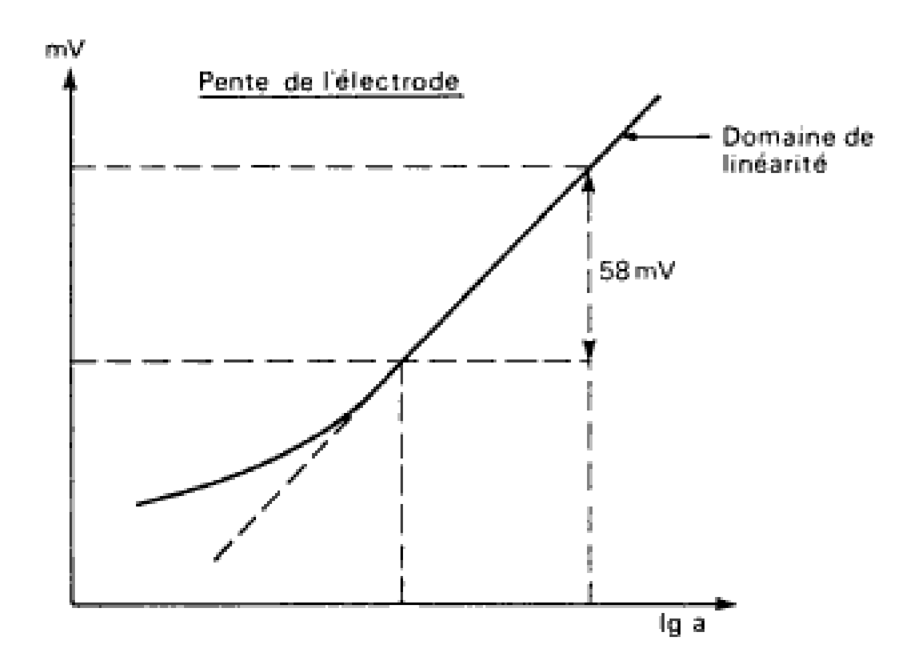


Fig. 19.4. Courbe E = f(lg a)

La linéarité fait défaut aux faibles valeurs et aux fortes valeurs d'activité (*fig. 19.4.*).

L'électrode à membrane mesure des activités (a) et non des concentrations. La concentration (C) est liée à l'activité (a) par un coefficient d'activité (γ) qui dépend de la force ionique et de la température.

Soit : $a = \gamma \cdot C$

Le principe de la mesure consiste à comparer les différences de potentiel obtenues d'une part avec un étalon de concentration connue, d'autre part avec l'échantillon à doser.

Les deux solutions doivent avoir des coefficients d'activité voisins.

Soit :

$$E_{ét.} = E_0 + E_{p1} + K_1 \lg a_{ét.} \quad (1)$$

$$E_{inc.} = E_0 + E_{p2} + K_2 \lg a_{inc.} \quad (2)$$

d'où : $$E = E_{ét.} - E_{inc.} = k \lg \frac{a_{ét.}}{a_{inc.}} \quad (3)$$

Cette expression n'est valable que si :

$$E_{p1} = E_{p2}$$

$$K_1 = K_2$$

D'où la nécessité de contrôler les potentiels parasites : E_p, et de maintenir constante la température T, principal facteur de variation de K. Les différences de viscosité ou de force ionique, la présence de protéines, de globules rouge retentissent sur E_p.

De l'équation (3), on tire : $a_{inc.} = a_{ét.} . K$.

tométrie de flamme et la potentiométrie indirecte conduisent à des résultats faussement abaissés. Les résultats obtenus par potentiométrie directe ne sont pas influencés par la teneur en eau plasmatique.

La formule de Waugh permet une détermination empirique de la teneur en eau plasmatique en fonction des concentrations en protéines et en lipides du plasma, et une correction des résultats obtenus par photométrie de flamme ou potentiométrie indirecte.

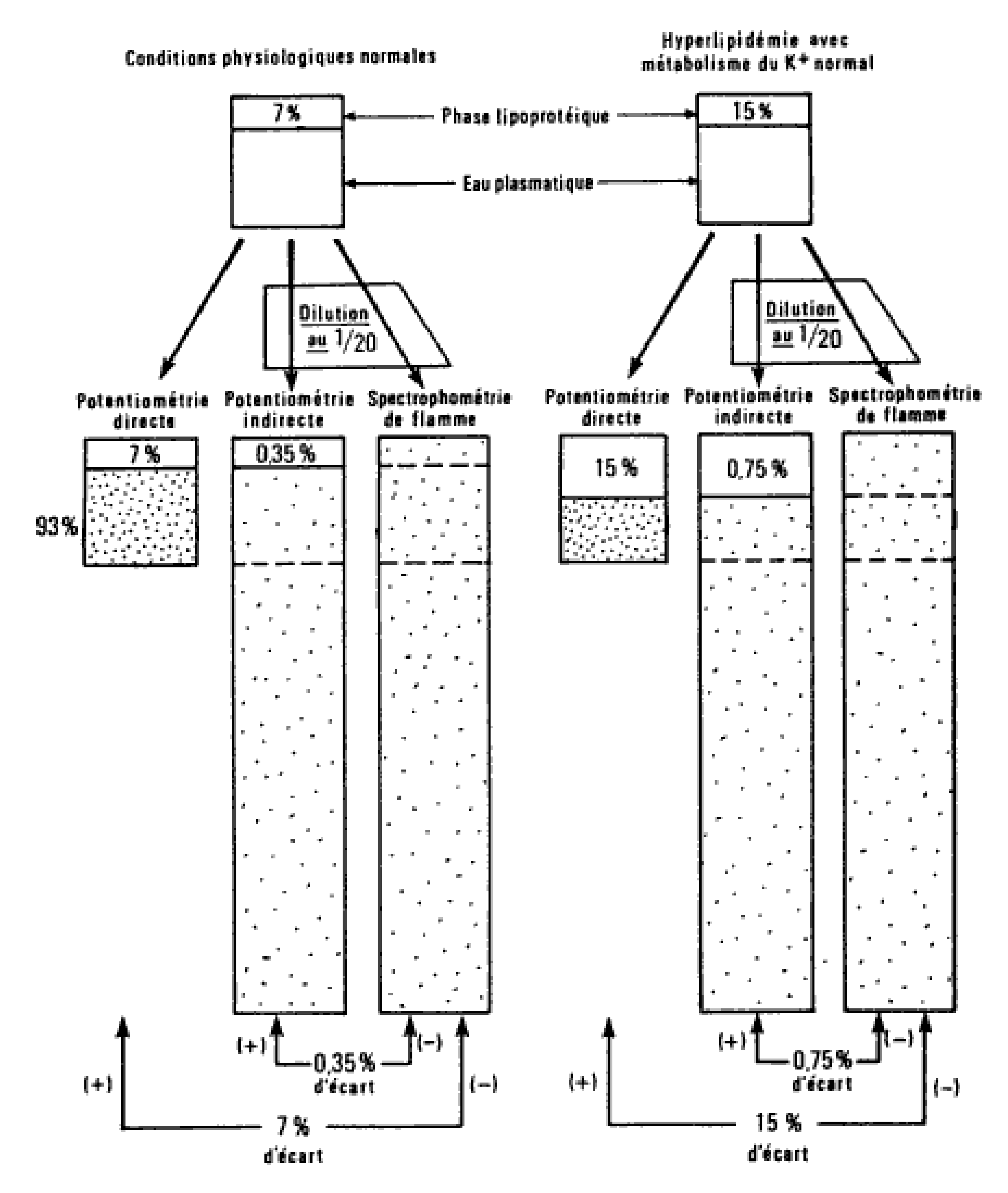


Fig. 19.5. Schéma illustrant le dosage du potassium plasmatique par les trois méthodes

6. EXERCICES

Exercice n° 1 : dosage du sodium plasmatique par photométrie de flamme (sujet Bac)

On dispose d'une solution étalon à 12 mmol de $Na^+.dm^{-3}$. On prépare une série de solutions filles à 0,24 ; 0,48 ; 0,72 ; 0,96 mmol $Na^+.dm^{-3}$.

1) Calculer la masse de Na_2HPO_4, $12H_2O$ à peser pour préparer la solution étalon à 12 $mmol.dm^{-3}$.

2) Préciser la préparation des solutions filles : calcul et technique.

3) Calculer la dilution à faire pour doser le plasma.

Données :
– Pl–Sodium (substc) 137-145 $mmol.dm^{-3}$.
– Na = 23 $g.mol^{-1}$; H = 1 $g.dm^{-3}$; P = 31 $g.dm^{-3}$; O = 16 $g.mol^{-1}$.

Exercice n° 2 : contrôle de la teneur en sodium d'un aliment par spectrophotométrie d'émission de flamme

m = 3,2 g d'échantillon à analyser sont minéralisés par voie sèche, dans un four à moufle à 550 °C. Les cendres blanches obtenues par calcination sont mises en solution aqueuse dans une fiole jaugée de 250 cm^3.

Pour étalonner l'appareil, on prépare 5 solutions contenant respectivement 0 ; 4 ; 8 ; 12 ; 16 ; 20 mg de Na^+ par dm^{-3}. Les mesures réalisées sur un photomètre de flamme à 585 nm sont celles indiquées dans le *tableau 19.VI*.

Tableau 19.VI.

N° solutions	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*Essai*
Concentration en Na^+ ($mg.dm^{-3}$)	–	4	8	12	16	20	x
Déviation	–	35	73	106	145	180	150

Déterminer la teneur en sodium de l'aliment, en g pour 100 g, par méthode graphique ou par régression linéaire.

Exercice n° 3 : dosage du sodium et du potassium plasmatiques par photométrie de flamme (extrait sujet Bac)

1) A partir de chlorure de sodium et de chlorure de potassium, purs et desséchés, on prépare une solution M_1 de sodium contenant 50 mmol de sodium par dm^3, et une solution M_2 de potassium contenant 25 mmol de potassium par dm^3.

Calculer la masse de solide à peser pour préparer un dm^3 de chacune des solutions.

Données : Na = 23 $g.mol^{-1}$; K = 39,1 $g.mol^{-1}$; Cl = 35,5 $g.mol^{-1}$.

2) Etalonnage du photomètre de flamme : les solutions étalons sont préparées de la manière suivante (*tabl. 19.VII*) :

Tableau 19.VII.

Solutions	F_1	F_2	F_3	F_4	F'_1	F'_2	F'_3	F'_4
Solution M_1 (cm^3)	4	3	2	1	–	–	–	–
Solution M_2 (cm^3)	–	–	–	–	4	2	1	0,2
Volume final (cm^3)	200	200	200	200	500	500	500	500
Déviations	100	75	50	25	90	46	22	5

Calculer, pour chaque solution, la concentration molaire exprimée en $mmol.dm^{-3}$.

3) Avant d'ajuster le niveau dans les fioles F'_1, F'_2, F'_3, F'_4, on ajoute un volume de solution M1 suffisant pour que la quantité de sodium présente corresponde à celle d'un plasma dilué au 1/50.

– Justifier cette opération.
– Calculer le volume de solution M_1 à ajouter.

4) Dosage du sodium et du potassium plasmatiques.
– Une dilution au 1/250 du plasma dans l'eau distillée, donne une déviation de 57 pour le dosage du sodium.
– Une dilution au 1/50 du plasma dans l'eau distillée, donne une déviation de 45 pour le dosage du potassium.

Calculer les concentrations plasmatiques en sodium et potassium exprimées en $mmol.dm^{-3}$. Commenter les résultats obtenus.

1.1. Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique (*fig. 20.1.*)

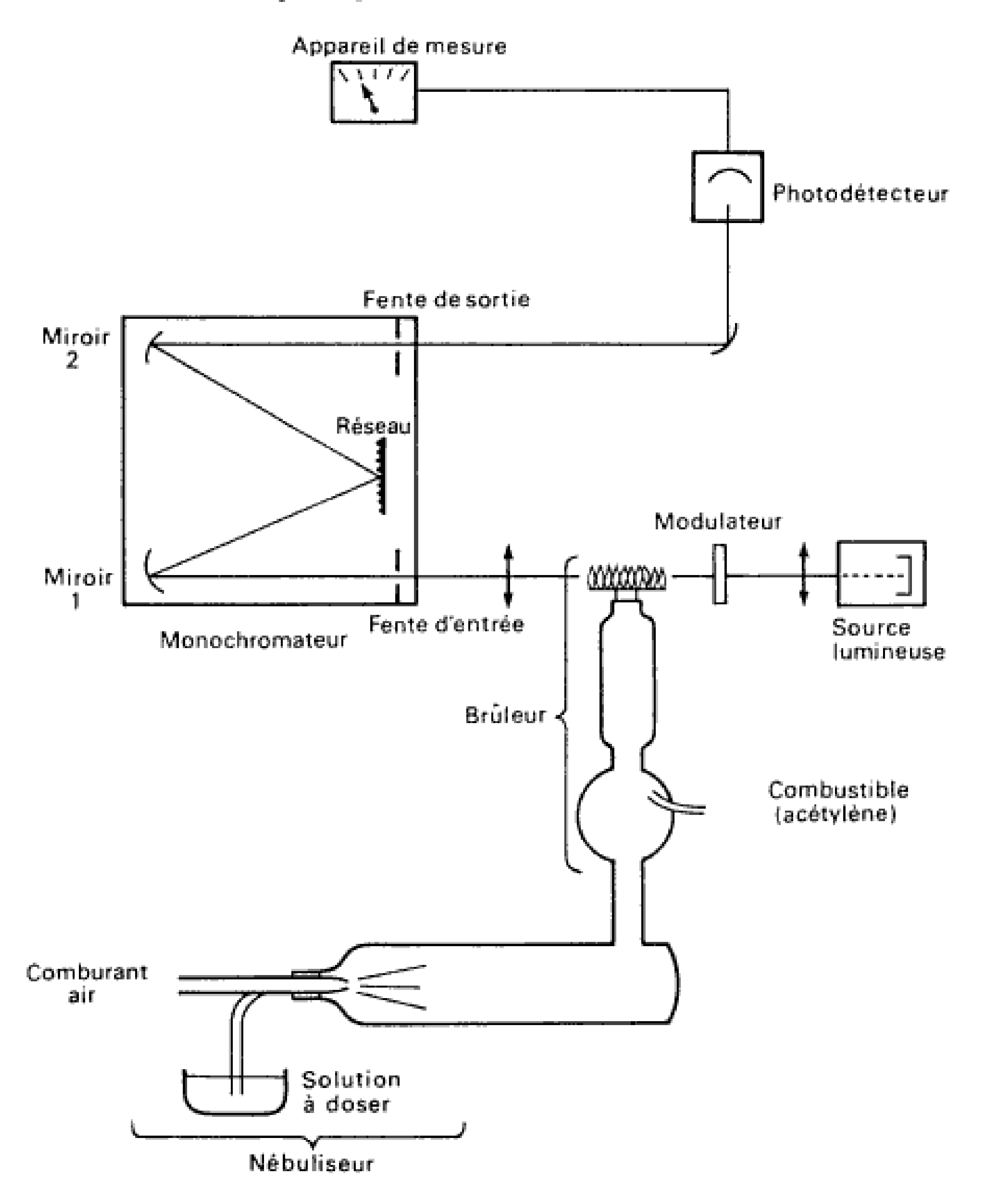


Fig. 20.1. Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique

1.1.1. La source lumineuse

La source lumineuse doit émettre une raie étroite, stable, caractéristique du spectre de l'élément à doser.

Les lampes à cathode creuse sont utilisables pour le doasage de nombreux éléments minéraux : lors du passage d'un courant électrique entre l'anode et la cathode il y a ionisation du gaz rare (argon ou néon), vaporisation puis excitation de certains atomes qui constituent le métal de la cathode creuse (*fig. 20.2.*).

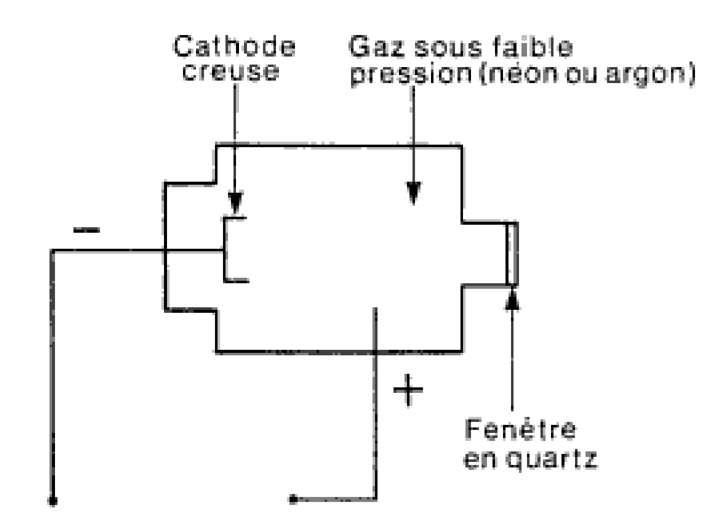


Fig. 20.2. Lampe à cathode creuse

1.1.2. Le générateur de vapeur atomique

Deux systèmes sont fréquemment utilisés :
- la flamme : moyen d'atomisation le plus souvent utilisé ;
- la cellule de vaporisation en graphite, chauffée électriquement : technique d'atomisation très sensible adaptée aux microdosages.

Rôle de l'atomisation : l'échantillon à analyser est nébulisé dans la partie réductrice d'une flamme large. Les molécules organiques sont détruites et les éléments minéraux sont en partie réduits à l'état d'atomes.

Peu des éléments à doser sont réduits dans la flamme, puis excités en absorbant les photons de la raie spécifique choisie. Aussi est-il important que la flamme soit stable, de température constante, large pour favoriser l'absorption lors de la traversée de la vapeur atomique par le flux lumineux.

La flamme est souvent produite par la combustion de l'acétylène dans l'air. La température de combustion (≈ 2 300 °C) doit être suffisamment élevée pour permettre la réduction des oxydes mais suffisamment basse pour limiter la formation d'ions à spectres d'absorption différents de ceux des atomes.

Des interférences peuvent exister :

• Deux éléments peuvent absorber à la même longueur d'onde (mêmes raies d'absorption).

• Les produits formés lors de la combustion ou ayant résisté à la combustion (oxydes) peuvent être à l'origine d'une absorption parasite ou encore diffuser la lumière quelle que soit la longueur d'onde de mesure.

• Les ions phosphates complexent de façon stable le calcium et diminue son absorption atomique. L'addition de chlorure de lanthane qui réagit avec les ions phosphates du milieu réactionnel permet un meilleur dosage du calcium.

La spectrophotométrie d'absorption atomique est une méthode très sensible :
– les limites de détectabilité vont de quelques $ng.cm^{-3}$ pour les métaux alcalins et alcalinoterreux (0,8 $ng.cm^{-3}$ pour le sodium) à quelques centaines de $ng.cm^{-3}$ pour les métaux de transition (500 $ng.cm^{-3}$ pour le mercure).
– la répétabilité est de 0,5 % à 3 % selon les techniques de dosage utilisées.

1.2.2. Applications au laboratoire d'analyses médicales : dosage des cations sériques (*fig. 20.3*)

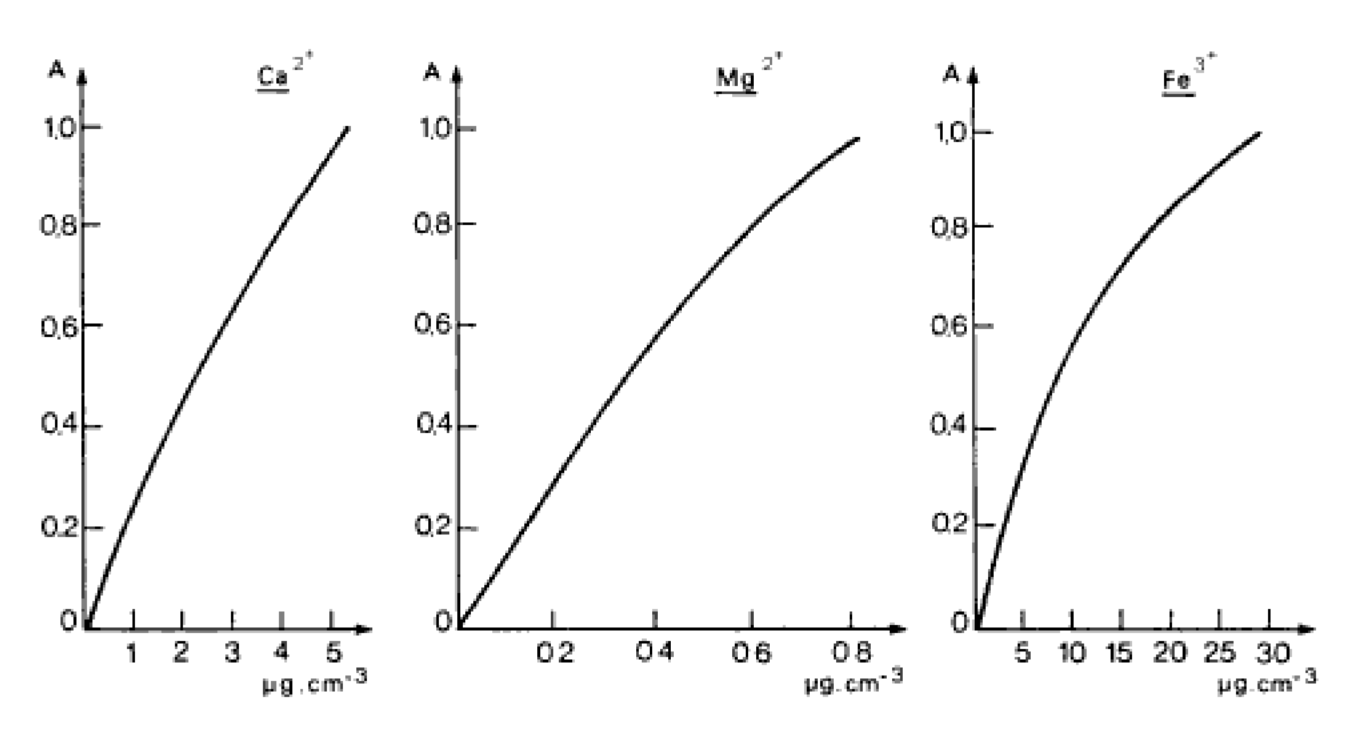


Fig. 20.3. Courbes d'étalonnage : dosage du calcium, dosage du magnésium, dosage du fer

• *La photométrie de flamme* est généralement utilisée pour le dosage des métaux alcalins (Na^+, K^+, Li^+) car cette méthode rapide et simple a, pour le dosage de ces ions, une meilleure sensibilité que la spectrophotométrie d'absorption.

Les limites de détection sont :
– en photométrie d'émission = Na^+ : 0,5 $ng.cm^{-3}$ K^+ : 0,05 $ng.cm^{-3}$;
– en absorption atomique (flamme) = Na^+ : 0,8 $ng.cm^{-3}$ K^+ : 3 $ng.cm^{-3}$.

• *Les métaux alcalino-terreux et les métaux de transition sont dosés par absorption atomique.*

Les limites de détection sont :
– en photométrie d'émission = Ca^{2+} : 0,2 ng.cm^{-3} ; Mg^{2+} : 70 ng.cm^{-3} ; Fe^{3+} : 30 ng.cm^{-3} ;
– en absorption atomique (flamme) = Ca^{2+} : 3 ng.cm^{-3} ; Mg^{2+} : 3 ng.cm^{-3} ; Fe^{3+} : 4 ng.cm^{-3} ;

Tableau 20.I.

Photométrie de flamme			*Spectrophotométrie d'absorption atomique*		
ions	longueur d'onde	dilution du sérum	ions	longueur d'onde	dilution du sérum
Na^{+}	589 nm	1/200 en eau distillée	Ca^{2+}	422,7 nm	1/50 en solution de dilution
K^{+}	766,5 nm	1/20 en eau distillée	Mg^{2+}	295,2 nm	1/50 en solution de dilution
Li^{+}	670,8 nm	1/50 en eau distillée	Fe^{3+}	248,3 nm	1/5 ou 1/10

Les éléments ayant une raie de résonance de longueur d'onde inférieure à 190 nm ne peuvent être dosés par spectrophotométrie d'émission ou d'absorption atomique : il s'agit des éléments non métaux dont le chlore, le phosphore, le soufre.

2. RÉACTIFS

• *Carbonate de calcium pur pour analyses* ($CaCO_3$; masse molaire = 100,09 g.mol^{-1}).

• *Acide chlorhydrique* concentré ou de concentration molaire volumique égale à 1 mol.dm^{-3}.

• *Acide chlorhydrique à 2 %.*

• *Solution de dilution* :
– chlorure de lanthane : 5,0 g ;
– chlorure de sodium : 1,0 g ;
– chlorure de potassium : 0,2 g ;
– H_2O q s p : 1 dm^3.

• *Biotrol ou sérum de bœuf.*

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Préparation d'une solution étalon de calcium à 25 $mmol.dm^{-3}$ par pesée de carbonate de calcium pur et anhydre (masse molaire = 100,09 $g.mol^{-1}$)

– Dans une capsule de pesée en verre, peser une masse m grammes de $CaCO_3$ pur et préalablement desséché au dessicateur.

– Dissoudre dans un minimum d'acide chlorhydrique concentré (ou dans environ 10 cm^3 de solution d'acide chlorhydrique de concentration molaire volumique égale à 1 $mol.dm^{-3}$).

– Transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 cm^3 et ajuster avec de l'eau distillée.

3.2. Dosage du calcium sérique par absorption atomique

3.2.1. Essai

Le dosage est réalisé sur du sérum dilué au 1/50 dans le liquide de dilution. Si un léger trouble apparaît, acidifier par de l'acide chlorhydrique à 2 %

3.2.2. Etalonnage de l'appareil

Préparer, en utilisant la solution de dilution, 50 cm^3 de solutions étalons de calcium, de concentrations comprises entre 0 et 0,1 $mmol.dm^{-3}$.

Faire les mesures.

3.3. Calculs

1) Calculer la masse de carbonate de calcium à peser pour préparer la solution étalon de calcium.

2) Donner sous forme de tableau la préparation de la gamme d'étalonnage.

3) Déterminer la calcémie du sérum analysé.

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. Calcul de la masse de carbonate de calcium à peser

$m = C \times M_{CaCO3} \times U = 25.10^{-3} \times 100,09 \times 100.10^{-3} = 0,250$ g.

Le carbonate de calcium est insoluble dans l'eau. Ajouter l'acide chlorhydrique jusqu'à ce que la solution devienne incolore.

4.2. Tableau de la préparation des solutions étalons

(*tabl. 20.II.*)

Tableau 20.II.

Solutions étalons $mmol.dm^{-3}$	0,025	0,05	0,075	0,1
Coefficient de dilution	$\frac{0,025}{25} = \frac{1}{1\,000}$	$\frac{0,05}{25} = \frac{2}{1\,000}$	$\frac{0,075}{25} = \frac{3}{1\,000}$	$\frac{0,1}{25} = \frac{4}{1\,000}$

La solution étalon de calcium à 25 $mmol.dm^{-3}$ doit être préalablement diluée au 1/20 par exemple (en solution de dilution).

La concentration en calcium sera alors de 1,25 $mmol.dm^{-3}$ (*tabl. 20.III.*).

Tableau 20.III.

Solution étalon à 1,25 $mmol.dm^{-3}$ (cm^3)	0	1	2	3	4	–
Sérum à doser (cm^3)	–	–	–	–	–	1
Solution de dilution (cm^3)	50	49	48	47	46	49

Détermination de la calcémie = 50.X $mmol.dm^{-3}$.

X étant la concentration en millimoles de calcium par dm^3 du sérum dilué au 1/50.



CONDUCTOMÉTRIE

SOMMAIRE PAGE

La variation de la conductivité d'une solution peut être mesurée au cours d'un dosage acido-basique, d'une réaction de précipitation ou d'un dosage par complexométrie...
La conductométrie permet d'évaluer la concentration en constituants ionisés d'un milieu : ions minéraux et acides organiques essentiellement.
La mesure de la conductivité est un paramètre de l'analyse de l'eau qui renseigne sur la qualité d'une eau potable, d'une eau de rivière ou d'un effluent.
Le but de la manipulation est de réaliser par conductométrie :
- **le contrôle de la teneur globale en ions d'une eau à analyser ;**
- **le dosage de l'activité d'un vinaigre étiqueté 6° et d'un vinaigre frelaté étiqueté 8°.**

1. PRINCIPE

1.1. Définitions : conductivité des électrolytes

1.1.1. Solution conductrice : électrolyte

On appelle électrolyte une solution qui laisse passer un courant électrique. Quand le circuit électrique est ouvert, les ions de l'électrolyte se déplacent librement parmi les molécules d'eau, mais dès que le circuit est fermé, les ions porteurs de charges se mettent en mouvement : les ions positifs ou cations migrent dans le sens conventionnel du courant tandis que les ions négatifs ou anions migrent dans le sens opposé.

1.1.2. Résistivité – Conductivité

La résistance d'un conducteur dépend de sa forme géométrique (*fig. 21.1.*).

Pour un conducteur électrolytique, la résistance est définie comme celle d'un conducteur métallique de section s et de longueur l, par la formule :

$$R = \rho \frac{l}{s}$$

R résistance en ohms (Ω).
ρ résistivité en ohms.cm (Ω.cm) ou en ohms.m (Ω.m).

ou encore :

$$R = \frac{1}{\chi} \times \frac{l}{s}$$

avec :

$$\chi = \frac{1}{\rho} = \frac{1}{R} \times \frac{l}{s}$$

1/R est la conductance (G) du conducteur, mesurée en siemens (ohm^{-1}) : symbole S.

χ est la *conductivité* de la solution ; elle s'exprime en siemens par mètre ($S.m^{-1}$) ou en siemens par cm ($S.cm^{-1}$).

La résistivité et donc la conductivité dépendent de la nature de l'électrolyte, de la concentration molaire et de la température.

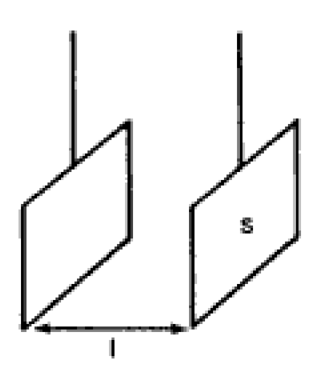


Fig. 21.1. Forme du conducteur électrolytique déterminée par la cellule

1.1.3. Conductivité équivalente

C'est le rapport de la conductivité de l'ion (χ_{ion}) sur sa concentration exprimée en moles de charges (C_e) ; c'est la conductivité par mole de charge portée par l'ion.

Conductivité équivalente ionique :

$$\lambda_e = \frac{\chi_{ion}}{C_e}$$

χ_{ion} : conductivité due à l'ion

Pour un ion donné, la concentration ionique C_e exprimée en moles de charges est égale au produit de sa concentration molaire C_i par la valeur absolue de sa charge z_i.
$C_e = C_i \times z_i$.

Unités usuelles pour λ_e : $S.cm^2.mol^{-1}$

d'où : $\lambda_e = 10^3 \frac{\chi_{ion}}{C_e}$ χ_{ion} en $S.cm^{-1}$; C_e en $mol.dm^{-3}$

1.1.4. Conductivité équivalente d'une solution : λ

La conductivité (χ) d'une solution est égale à la somme des conductivités des ions présents :

$$\chi = \chi_{cation} + \chi_{anion} = 10^{-3} z_{i1} C_1 \lambda_{e1} + 10^{-3} z_{i2} C_2 \lambda_{e2} \ldots$$

Pour une solution de nitrate d'argent ($AgNO_3$) à 0,1 mol.dm^{-3} :

$$\chi_{AgNO3} = \chi_{Ag+} + \chi_{NO3-} = 10^{-3} z_{(Ag+)} C_{(Ag+)} \lambda_{e(Ag+)} + 10^{-3} z_{(NO3)-} C_{(NO3)-} \lambda_{e(NO3-)}$$

$z_{Ag+} C_{Ag+} = z_{NO3-} C_{NO3-} = C_e = 0{,}1$ mole de charges de chaque signe portées par l'électrolyte dans un dm^3 de solution.

$$\chi_{AgNO3} = 10^{-3} C_e (\lambda_{e(Ag+)} + \lambda_{e(NO3^-)}) = 10^{-3} C_e \lambda = 0{,}1\ 10^{-3}.\lambda = 10^{-4} \lambda$$

Pour une solution de chlorure de baryum ($BaCl_2$) à 0,02 mol.dm^{-3} :

$$\chi_{BaCl2} = \chi_{Ba2+} + \chi_{Cl-} = 10^{-3} z_{(Ba^{2+})} C_{(Ba^{2+})} \lambda_{e(Ba^{2+})} + 2\ 10^{-3} z_{(Cl-)} C_{(Cl-)} \lambda_{e(Cl-)}$$

$z_{Ba^{2+}} C_{Ba^{2+}} = 2 \times z_{Cl-} C_{Cl-} = C_e = 2 \times 0{,}02 = 0{,}04$ mole de charges de chaque signe dans un dm^3 de solution.

$$\chi_{BaCl2} = 10^{-3} C_e (\lambda_{e(Ba^{2+})} + \lambda_{e(Cl-)}) = 10^{-3} C_e \lambda = 0{,}04\ 10^{-3} \lambda = 4\ 10^{-5} \lambda$$

Pour une solution d'acide acétique (CH_3COOH) à 0,01 mol.dm^{-3} :

$Z_{CH3COO-} C_{CH3COO-} = z_{H+} C_{H+} = C_e = 0{,}01$ mole de charges de chaque signe que l'électrolyte apporterait par dm^3 de solution, s'il était totalement dissocié.

La conductivité équivalente d'un électrolyte est :

$$\lambda = \frac{10^3 \cdot \chi}{C_e}$$

1.1.5. Conductivité équivalente limite : λ_o

La conductivité équivalente dépend de la concentration. Pour les très grandes dilutions de l'électrolyte (ou très faibles concentrations), les interactions entre les ions sont négligeables, les mobilités des ions ne sont pas mutuellement influencées.

Pour C_e très faibles, les conductivités équivalentes ioniques peuvent être considérées comme pratiquement constantes et la conductivité équivalente de l'électrolyte tend vers une limite λ_O.
avec : $\lambda_O = \lambda_{Ocation} + \lambda_{Oanion}$
$\lambda_{Ocation}$ et λ_{Oanion} sont caractéristiques des ions de l'électrolyte.
λ_O est caractéristique de l'électrolyte.

Exemples de conductivités équivalentes limites (λ_O) en solution aqueuse, à 25 °C (S.cm^2.mol^{-1}) :

– cations : $H^+ = 350$; $K^+ = 74$; $Na^+ = 50$; $NH_4^+ = 75$; $Ag^+ = 54$; $Ca^{2+} = 60$; $Ba^{2+} = 63{,}5$.

– anions : $OH^- = 198$; $SO_4^{2-} = 80$; $Cl^- = 76$; $IO_3^- = 40{,}5$; $NO_3^- = 71$; $CH_3COO^- = 40$.

Connaissant les valeurs des différents λ_0 (tables de constantes physiques), il est possible de déterminer la conductivité équivalente limite λ_0 d'un électrolyte donné.

Expérimentalement, il n'est pas possible de mesurer avec précision χ si on travaille avec des concentrations trop faibles en électrolyte.

Dans le cas d'un électrolyte fort, la conductivité équivalente est donnée par la relation : $\lambda = \lambda_0 - k\sqrt{C_e}$ avec k constante qui dépend de la nature de l'électrolyte. Pour obtenir λ_0, il est possible d'extrapoler la courbe $\lambda = f(C_e)$ pour $C_e = 0$.

1.2. Mesure des conductivités

La cellule conductométrique

La mesure d'une conductivité consiste à déterminer la résistance d'une colonne H de la solution électrolytique placée entre deux plaques de platine recouvertes de noir de platine, de surface S donnée et séparées par une distance l constante (Fig. 21.1).

Cette cellule de mesure est insérée dans une branche d'un pont de Kolrausch situé dans le boitier du conductimètre (*fig. 21.2*).

On utilise du courant alternatif pour éviter les processus d'électrolyse au niveau des électrodes.

Quand le pont est « équilibré », il ne passe aucun courant dans le microampèremètre :

$$\frac{R}{R3} = \frac{R2}{R1}$$

R : résistance électrolytique = $\frac{R2}{R1} \times R3$

$$R = \frac{1}{c} \times \frac{l}{s} \qquad \frac{1}{c} = R \times \frac{s}{l} = R \times k$$

$k = \frac{s}{l}$:

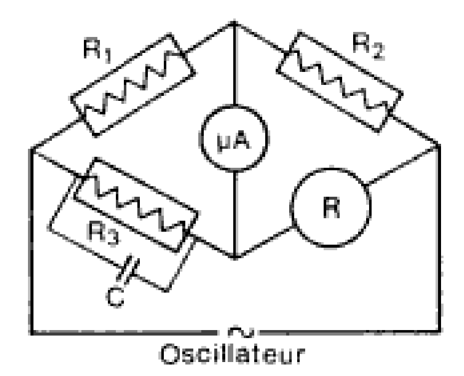


Fig. 21.2. Mesure d'une résistance par un pont de Kolrausch

constante de la cellule déterminée par la mesure de la résistance d'une solution étalon de χ connue (par exemple : solution de KCl à 0,1 mol.dm^{-3} qui a une conductivité de 0,01116 S.cm^{-1} à 18 °C et de 0,01285 S.cm^{-1} à 25 °C).

La résistivité $\rho = 1/\chi$ s'obtient en multipliant la résistance lue sur le conductimètre par la constante de la cellule.
La conductivité χ est l'inverse de la résistivité.

L'eau permutée ou distillée contient du CO_2 dissous (voir chapitre 1) et de nombreuses impuretés qui interfèrent sur les mesures de conductivité dans le cas de solutions à doser très faiblement concentrées. Il faut utiliser de l'eau bidistillée préparée extemporanément (χ le plus faible possible $\leq 10^{-6}$ S.cm^{-1}).

1.3. Dosages conductométriques

1.3.1. Principe

Quand on fait réagir ensemble deux substances en solution, la conductivité de la solution varie :
– si le nombre total des ions varie (certains ions entrent dans la structure de molécules non dissociées, ou inversement) ;
– si les ions ajoutés ou formés ont une mobilité différente : si la mobilité d'un ion augmente, la conductivité équivalente λ augmente et inversement.

Il faut choisir correctement le réactif de dosage : au niveau du point d'équivalence l'apport en excès du réactif de dosage doit entraîner une variation différente de la conductivité qui se traduit par un changement de pente sur la courbe $1/R = f(Vcm^3)$.

Le réactif de dosage doit avoir une concentration 10 à 20 fois plus grande que la solution à doser afin qu'au cours du dosage la dilution du milieu de mesure ne soit pas trop grande.

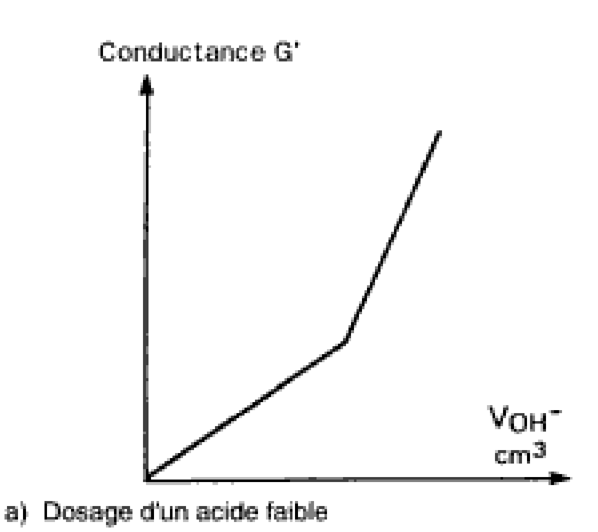
Il est possible d'éliminer l'influence de la dilution en corrigeant les valeurs lues.
L'introduction d'un volume V cm^3 dans la prise d'essai de E cm^3 à doser, crée une dilution d'un facteur :

$$\frac{E}{E+V}$$

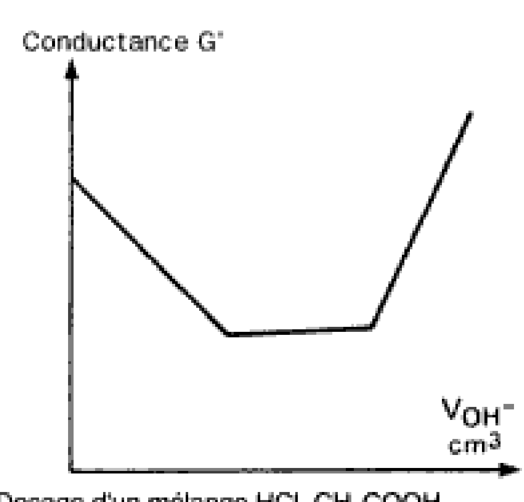
Ainsi, on définit la conductance corrigée par : $G' = G \times \frac{E+V}{V}$

χ et 1/R varient dans le même sens. Graphiquement, on porte 1/R' ou, la conductance corrigée G', car le dosage consiste à suivre la variation de la conductivité, en fonction du volume de solution versée.

1.3.2. Interprétation de courbes de dosage



a) Dosage d'un acide faible



b) Dosage d'un mélange $HCl–CH_3COOH$

Fig. 21.3. Courbes de titrage conductométrique

Rincer soigneusement le bécher, la burette et les électrodes avec de l'eau distillée.

Dans un bécher introduire :

E = 20 cm^3 de vinaigre à analyser dilué au 1/100 ; 50 cm^3 d'eau distillée.

Verser à la semi–microburette cm^3 par cm^3 une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 $mol.dm^{-3}$ préalablement étalonnée par pesée d'un produit pur pour analyses.

Faire la mesure de la conductance de la solution après chaque addition de soude et agitation (agitateur magnétique).

Un dosage potentiométrique des deux vinaigres peut être réalisé en parallèle aux dosages par conductométrie.

3.3. Questions

1) Contrôle de la minéralisation d'une eau.

Calculer la conductivité en $microsiemens.cm^{-1}$ ($\mu S.cm^{-1}$).

2) Dosage de l'acidité de deux vinaigres :
– tracer sur papier millimétré les courbes G' = f (V_{OH} – cm^3) ;
– interpréter l'allure des courbes ;
– déterminer les points équivalents ;
– calculer la concentration en moles d'acide acétique par litre des deux vinaigres ;
– déterminer le degré d'acidité des deux vinaigres analysés ;
– quel est le degré d'acidité du vinaigre frelaté si l'acidité totale est exprimée en acide acétique ?

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. Mesure de la conductivité d'une eau

La conductivité électrique de l'eau ($\mu S.cm^{-1}$) est donnée par l'expression :

$$\chi = 1/R \times K \times 10^6$$ (K constante d'étalonnage de la cellule).

Cette mesure est donnée à 20 °C en France. Pour toute autre température de mesure, effectuer la correction suivante : $\chi_{20\,°C} = \chi_{t\,°C} \times f$.

En annexe du chapitre : tableau des facteurs de correction f.

4.3. Dosage conductométrique des vinaigres

- *Vinaigre non frelaté* :

Soit V_e (cm^3) le volume équivalent.

La concentration en moles d'acide acétique par dm^3 est = $\dfrac{V_e \times C_{OH^-}}{E_{vinaigre}}$

Soit m g la masse de E = 20 cm^3 de vinaigre.

Le degré d'acidité du vinaigre est : $C_{OH^-} \times V_e \; 10^{-3} \times M_{a.\ acétique} \times \dfrac{100}{m}$

- *Vinaigre frelaté* :

Soit V_{e1} (cm^3) et V_{e2} (cm^3) les volumes équivalents.

La concentration en moles d'acide acétique par dm^3 est = $\dfrac{(V_{e2} - V_{e1}) \times C_{OH^-}}{E_{vinaigre}}$

Soit mg la masse de E = 20 cm^3 de vinaigre.

Le degré d'acidité du vinaigre est : $C_{OH^-} \times (V_{e2} - V_{e1}) \; 10^{-3} \times M_{a.\ acétique} \times \dfrac{100}{m}$

Le degré d'acidité frauduleux est : $C_{OH^-} \times V_{e2} \; 10^{-3} \times M_{a.\ acétique} \times \dfrac{100}{m}$

6. EXERCICES

Exercice n° 1 : conductivités équivalentes limites : unités

Exprimer les conductivités équivalentes limites des ions suivants dans les unités du système international :

H^+ : $\lambda_0 = 350\ S.cm^2.mol^{-1}$; Na^+ : $\lambda_0 = 50\ S.cm^2.mol^{-1}$.

Exercice n° 2 : conductivité équivalente d'un électrolyte fort

Les conductivtés équivalentes de trois solutions de chlorure de sodium à 10^{-1}, 10^{-2} et 10^{-3} mol.dm^{-3} sont respectivement : 111, 119, 124 S.cm^2.mol^{-1}.

Calculer la conductivité équivalente d'une solution infiniment diluée.

Données : Na^+ : $\lambda_0 = 50\ S.cm^2.mol^{-1}$; Cl^- : $\lambda_0 = 76\ cm^2.mol^{-1}$.

Exercice n° 3 : dosages conductométriques

Parmi les tracés graphiques de la *figure 21.4.*, préciser celui qui correspond au dosage :
- d'une solution de nitrate d'argent par du chlorure de sodium ;
- d'une solution d'acide chlorhydrique par de l'hydroxyde de sodium ;
- d'une solution de chlorure d'ammonium par de l'hydroxyde de sodium ;
- d'une solution d'acétate de sodium par de l'acide chlorhydrique ;
- d'une solution de sulfate de sodium par du chlorure de baryum ;
- d'un mélange de chlorure d'ammonium et d'acide chlorhydrique par de l'hydroxyde de sodium .

Justifier les réponses.

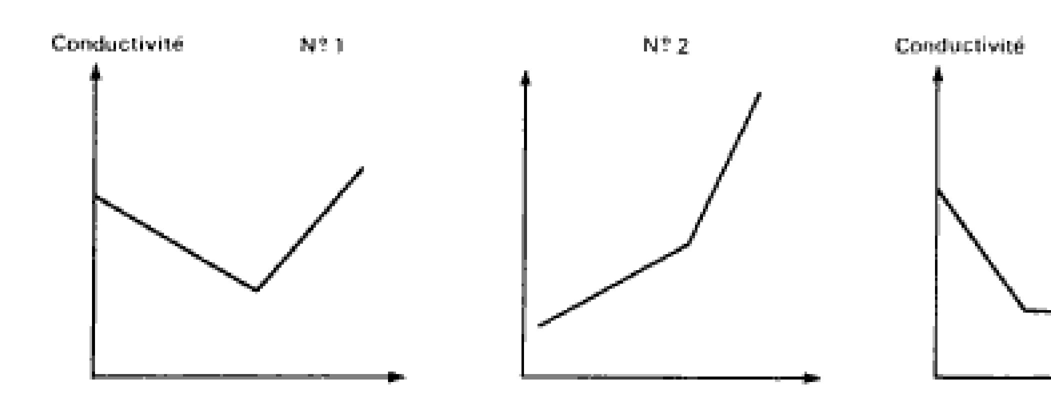


Fig. 21.4.

Exercice n° 4 : analyse de l'eau d'une rivière au niveau d'une station d'épuration des eaux (*tabl. 21.II.*)

5 prélèvements ont été réalisés.

- Prélèvement n° 1 : au niveau du village, en amont de la station d'épuration des eaux.
- Prélèvement n° 2 : en aval de la station d'épuration.
- Prélèvement n° 3 : à 5 km en aval de la station d'épuration.
- Prélèvement n° 4 : à 10 km en aval de la station d'épuration.

Tableau 21.II :

Paramètres	*Prélèvements*			
	n° 1	*n° 2*	*n° 3*	*n° 4*
Aspect	limpide	léger trouble	limpide	limpide
Couleur	incolore	jaunâtre	incolore	incolore
Température °C	8,6	10,0	10,3	10,5
pH	7,9	7,9	7,9	7,8
Conductivité $\mu s.cm^{-1}$	489	615	465	462
Matières En Suspension (MES en $mg.dm^{-3}$)	12	6	< 3	< 3
O_2 dissous en $mg.dm^{-3}$	11	9,0	8,5	7,9
% saturation en O_2	95	80	75	71
Demande Chimique en Oxygène (DCO en $mg.dm^{-3}$	7	90	13	10
N total Kjeldahl en $mg.dm^{-3}$	1	2	1	1
NH_4^+ en $mg.dm^{-3}$	0,06	0,94	0,07	0,05
Nitrites (NO_2^-) en $mg.dm^{-3}$	0,01	0,08	0,05	0,04
Nitrates (NO_3^-) en $mg.dm^{-3}$	7,2	3,4	4,2	5,4
Phosphore total en $mg.dm^{-3}$	< 0,05	6,5	0,5	0,4
Titre Hydrotimétrique Français (TH °F)	33	30	29	30
Titre Alcalimétrique Complet (TAC)	22,5	26,8	22	23
Chlorures	23	54	25	24

Quelles sont les influences du rejet des eaux usées de la station d'épuration sur les qualités physicochimiques de l'eau de rivière ?

3. MODE OPÉRATOIRE

Bien respecter les précautions de sécurité inhérentes à l'utilisation de solvants inflammables à vapeurs toxiques. Eviter toute flamme dans le laboratoire et travailler de préférence sous hotte.

3.1. Obtention de l'extrait lipidique total

- Tarer le ballon de l'extracteur après passage à l'étuve, soit m grammes.
- Peser une masse de l'ordre de 1 à 2 grammes de matériel biologique sec et pulvérisé dans la cartouche d'extraction, soit m grammes. La cartouche doit être remplie au maximum au trois quarts de sa capacité. L'obturer avec du carton hydrophile pour éviter les projections de produit.
- Imprégner la cartouche avec du chloroforme.
- Remplir le ballon aux deux-tiers de sa capacité avec du chloroforme.
- Réaliser le montage représenté sur la *figure 22.2*.

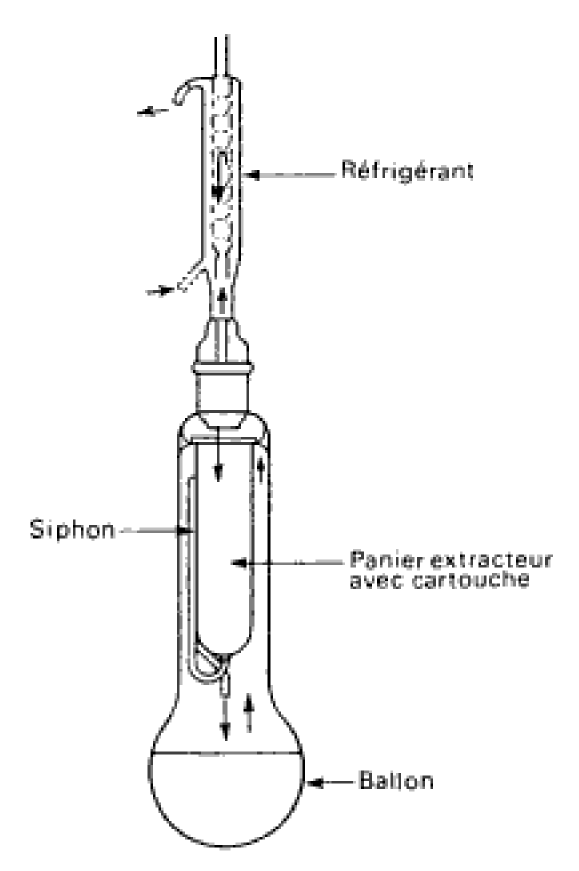


Fig. 22.2. Extracteur de Kumagawa

4. EXPLOITATION DES RÉSULTATS

1) Déterminer la masse de lipides extraite et rapporter cette masse à 100 g de matériel biologique sec. Pour le lait en poudre, comparer avec le résultat indiqué sur l'étiquette. Conclure.

2) Analyser les résultats obtenus par CCM.

Conclure sur la nature des lipides contenus dans les extraits. Tous les spots sont-ils identifiables ?

Comparer les différents extraits analysés.

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Pourquoi l'extraction a-t-elle été faite à chaud ?

Exercice n° 2 :

Imaginer une technique permettant une détermination quantitative du taux de phosphore lipidique dans l'extrait.

Exercice n° 3 :

Dans le cas d'une extraction liquide-liquide, comment choisit-on le solvant extracteur ? Rappeler la définition du coefficient de partage ?

Application numérique : à une température donnée, les solubilités d'un composé A dans l'éther et dans l'eau sont respectivement de 10 grammes et 4 grammes pour 100 cm^3 de solvant. Si 100 cm^3 d'une solution aqueuse de A contient 4 grammes de ce composé, calculer :
- la masse de A extraite par 100 cm^3 d'éther ;
- la masse de A extraite par deux fois 50 cm^3 d'éther. Conclure.



INTRODUCTION À L'UTILISATION DES ÉCHANGEURS D'IONS

SOMMAIRE

PAGE

Le but cette manipulation est de déterminer quelques caractéristiques d'une résine :

- **la capacité totale (ou maximale) d'échange ;**
- **la constante d'échange vis-à-vis de plusieurs cations.**

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **support ou matrice ;**
- **groupement fonctionnel et contre-ion ;**
- **équilibre et déplacement d'équilibre ;**
- **constante d'échange ;**
- **accessibilité ;**
- **capacité réelle d'échange (ou capacité disponible) et les facteurs dont elle dépend ;**
- **procédé en batch et chromatographie sur colonne ;**
- **régénération.**

1. PRINCIPE

Une résine sulfonique, échangeuse cationique forte, symbolisée $R\text{-}SO_3^-{}_R\ H^+{}_R$ est mise en contact par la technique en batch avec une solution de chlorure symbolisée $X^+{}_s\ Cl^-{}_s$ de *concentration connue.*

Un équilibre d'échange s'établit suivant l'équation :

$$R\text{-}SO_3^-{}_R\ H^+{}_R + X^+{}_s\ Cl^-{}_s \rightleftarrows R\text{-}SO_3^-{}_R\ X^+{}_R + H^+{}_s\ Cl^-{}_s$$

En applicant la loi d'action de masse à cet équilibre, on exprime la constante d'échange entre les ions $H^+{}_R$ et X +s, K_{H+}^{X+}

$$K_{H+}^{X+} = \frac{(X_R^+)\,(H_s^+)}{(X_s^+)\,(H_R^+)} \text{ ou } \frac{\dfrac{(X_R^+)}{(H_R^+)}}{\dfrac{(X_s^+)}{(H_s^+)}}$$

qui traduit le coefficient de partition entre la phase stationnaire et la phase mobile.

• Le dosage des ions H^+ *dans la phase liquide* (H^+_s), soit par volumétrie, soit par conductométrie, soit par pHmètre, à l'aide d'une solution étalonnée d'hydroxyde de sodium permettra de calculer cette constante et de comparer l'affinité variable de la résine suivant la nature chimique de X^+.

• Pour déterminer la capacité totale d'échange de la résine il suffira de déplacer l'équilibre précédant :
– en choisissant un cation de forte affinité ;
– en l'utilisant à forte concentration ;
– en dosant les protons libérés *en présence de la résine.*

2. MATÉRIELS ET RÉACTIFS

• Résine échangeuse cationique forte sous forme acide (par exemple Amberlite IR 120 H) desséchée à l'étuve plusieurs heures à 100 °C.

• Solution de $Na^+ Cl^-$ à 0,1 mol.dm $^{-3}$.

• Solution de $K^+ Cl^-$ à 0,1 mol.dm $^{-3}$.

• Solution de $Mg^{2+} 2 Cl^-$ à 0,1 mol.dm $^{-3}$.

• Solution d'hydroxyde de sodium à ≃ 0,1 mol.dm $^{-3}$ étalonnée.

• $BaCl_2$ cristallisé.

• pHmètre ou conductimètre ou burette et solution de phénolphtaléine suivant la méthode protométrique choisie.

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Détermination de la capacité totale d'échange de la résine

– Peser avec précision dans un bécher 2 g de résine sèche.

– Ajouter 100 cm^3 d'eau déminéralisée et environ 5 g de $BaCl_2$ cristallisé.

– Agiter pendant 15 à 20 min.

– Doser l'acidité libérée dans la phase liquide en *présence de la résine* à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 $mol.dm^{-3}$. Attendre 2 à 3 minutes la fin du déplacement d'équilibre. Soit Vcm^3 le point d'équivalence.

3.2. Détermination des constantes de sélectivité vis-à-vis des ions Na^+, K^+ et Mg^{2+}

1) Peser avec précision dans un bécher 2 g de résine sèche.

– Ajouter 100 cm^3 d'une solution de chlorure de sodium à 0,1 $mol.dm^{-3}$.

– Agiter 15 à 20 min pour que l'équilibre s'établisse.

– Sur une prise d'essai de *20 cm^3 de surnageant*, doser l'acidité libérée à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 $mol.dm^{-3}$ (dilution précise de la solution-mère utilisée précédemment).

Soit V_{Na^+} cm^3 le point d'équilibre.

2) On opérera de même avec une solution à 0,1 $mol.dm^{-3}$ de chlorure de potassium et une solution à 0,1 $mol.dm^{-3}$ de chlorure de magnésium. Soient V_{K^+} cm^3 et $V_{Mg^{2+}}$ cm^3 les points d'équivalence correspondants.

– On fera un témoin avec 2 g de résine sèche et 100 cm^3 d'eau déminéralisée. Soit V_T cm^3 le point d'équivalence.

3.3. Régénération de la résine utilisée

Elle se fait par déplacement d'équilibre en augmentant de manière très importante la concentration en H^+.

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Comment pourrait-on utiliser ces résultats pour séparer par chromatographie sur colonne un mélange d'ions Na^+ et K^+ ? Discuter en particulier les conditions d'élution.

Exercice n° 2 :

D'autres échangeurs d'ions sont de nature polysaccharidique et de type « échangeur faible ». La *figure 23.1* représente des courbes de titration de différents échangeurs placés dans une solution de chlorure de potassium.

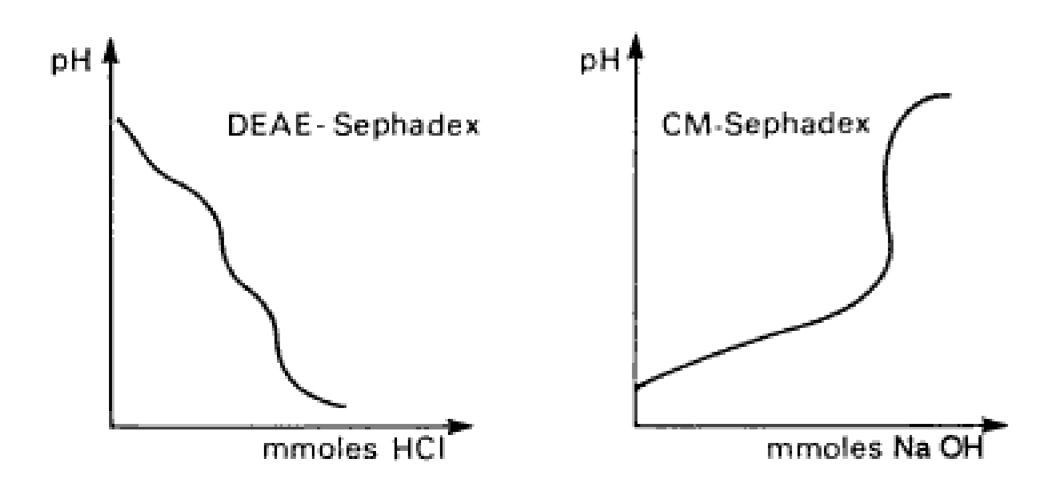


Fig. 23.1.

- Commenter ces résultats expérimentaux.
- Discuter les variations de la capacité d'échange en fonction du pH.
- Comment choisit-on le pH dans le cas de séparation de molécules amphotères ?

Exercice n° 3 :

La fiche technique d'un échangeur d'ions fournie par un fabricant porte les indications suivantes : très grande efficacité séparative, macroporosité, distribution granulaire fine et étroite, haute résistance mécanique, stabilité chimique et thermique, grande durée de vie, non biodégrabilité.

Discuter les avantages de ces propriétés lors de l'utilisation répétée en chromatographie dans un laboratoire.



LA CHROMATOGRAPHIE PAR ÉCHANGE D'IONS. APPLICATION À LA SÉPARATION D'ACIDES AMINÉS

SOMMAIRE

PAGE

Le but de la manipulation est :
• de séparer deux acides aminés de pHi différents par chromatographie sur colonne de résine échangeuse cationique faible,
• de suivre cette séparation spécifiquement.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **résine échangeuse de cations faible ;**
- **pHi ;**
- **molécule amphotère ;**
- **force ionique.**

1. PRINCIPE

Le mélange à analyser contient deux molécules amphotères : de la *tyrosine*, acide aminé aromatique neutre de pHi = 5,7, présentant un pic d'absorption à 273 nm et de *l'arginine*, acide aminé basique de pHi = 10,8 caractérisable par une réaction colorée spécifique du groupement guanidine : la réaction de Sakaguchi.

Ces deux acides aminés sont séparés par passage sur une résine carboxylique échangeuse cationique faible, l'Amberlite IRC 50 sous forme sodique, équilibrée en tampon citrate pH 5,8 à 0,1 mol.dm $^{-3}$.

A ce pH, la tyrosine est majoritairement sous forme de zwitterion et n'est pas retenue alors que l'arginine, sous forme cationique est fixée (sens 1 de l'équation ci-dessous). L'arginine est ensuite éluée par élution isocratique en augmentant la force ionique du tampon : tampon citrate de sodium pH 5,8 à 0,4 mol.dm $^{-3}$, ce qui déplace l'équilibre dans le sens 2.

$$\left(\begin{array}{l} \sim\sim COO^- Na_R^+ \\ \sim\sim COO^- Na_R^+ \end{array}\right) + Arg^{2+} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \left(\begin{array}{l} \sim\sim COO^- \\ \sim\sim COO^- \end{array} + Arg_R^{2+}\right) + 2\,Na_S^+$$

La « filtration » de la tyrosine est suivie par mesure de l'absorbance à 273 nm des différentes fractions recueillies. Un dosage colorimétrique de l'arginine par une réaction de Sakaguchi légèrement modifiée permet d'établir un rendement de récupération.

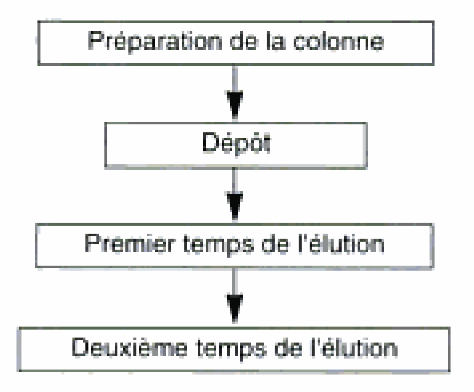
2.2. Matériel

- Colonne à chromatographie ordinaire de hauteur ≃ 20 cm et de diamètre ≃ 1 cm.
- Cuves spéciales UV.
- Tubes « jaugés » à 3 cm^3.
- Pulvérisateurs.
- Capillaires.

REMARQUE : conditionnement de la résine avant un premier emploi :
– faire gonfler la résine en l'agitant pendant une heure dans Na_2CO_3 à 1 $mol.dm^{-3}$;
– percoler sur filtre Büchner en alternant quatre fois HCl à 2 $mol.dm^{-3}$ et Na_2CO_3 à 1 $mol.dm^{-3}$ avec un rinçage entre chaque opération. Pour chaque échange, utiliser une quantité de réactif au moins égale à 10 fois la capacité maximum d'échange ;
– puis conserver la résine dans le tampon utilisé.

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Plan de la manipulation



- Placer au fond de la colonne un tampon de laine de verre.
- Verser lentement la résine en suspension dans le tampon de manière à obtenir une colonne de résine de 15 cm de hauteur en évitant les bulles d'air et les fissures (tapoter légèrement la colonne avec un agitateur muni d'un policeman.
- Vérifier le pH de l'effluent de la colonne.

• Abaisser le niveau du tampon surnageant de manière que le ménisque soit tangent à la surface de la résine.

Ne jamais laisser la colonne à sec.

• Déposer délicatement 1 cm^3 du mélange M à analyser à la surface de la résine en évitant de remettre celle-ci en suspension.

• Respecter toutes les précautions décrites dans le chapitre 15.

• Eluer avec le tampon citrate pH 5,8.

• Recueillir les filtrats par fraction de 3 cm^3 appelés F_1, F_2... F_{15}.

• Régler la vitesse d'écoulement à 1 goutte toutes les 10 secondes.

• Mesurer l'absorbance à 273 nm de chaque fraction dans une cuve spéciale UV.

• A l'aide d'un capillaire, déposer à intervalles réguliers sur deux bandes de papier Whatmann 2 gouttes de chaque fraction F recueillies :
– une bande sera révélée par la réaction de Gerngross spécifique de la tyrosine ;
– l'autre bande par la réaction de Sakaguchi spécifique de l'arginine.

• Regrouper toutes les fractions F dans une fiole de 100 cm^3. Soit F ce filtrat.

• Remplacer le tampon citrate pH 5.8 à 0,1 $mol.dm^{-3}$ par du tampon citrate pH 5,8 à 0,4 $mol.dm^{-3}$.

• Recueillir l'éluat dans une fiole de 50 cm^3.

• Compléter à 50 cm^3 avec de l'eau déminéralisée. Soit E cet éluat.

3.2. Indications pour la révélation des bandes de papier Whatmann

3.2.1. Révélation de la tyrosine

• Pulvériser sur la bande la solution d'α nitroso ß naphtol.

• Sécher dans un courant d'air chaud.

• Effectuer une seconde vaporisation avec l'acide nitrique à 10 %.

• Chauffer 3 min à 90 °C.

3.2.2. Révélation de l'arginine

• Pulvériser la réactif obtenu en mélangeant 1 cm^3 de NaOH à 5 $mol.dm^{-3}$ avec 10 cm^3 de la solution d'α naphtol.

• Sécher dans un courant d'air froid.

• Appliquer une pulvérisation très légère de la solution d'hypobromite de sodium.

3.3. Dosage colorimétrique de l'arginine dans M, F et E

3.3.1. Etalonnage du spectrophotomètre

- Préparer une solution fille d'arginine à 100 µg.cm $^{-3}$ à partir de la solution-mère à 0,5 g.dm $^{-3}$.

- Réaliser l'étalonnage suivant en *opérant tube par tube* :

– prise de 0,1 à 0,5 cm^3 ;
– eau déminéralisée q s p 0,5 cm^3 ;
– NaOH à 3 mol.dm $^{-3}$: 0,5 cm^3 ;
– solution d'hydroxyquinoléine : 1 cm^3 ;
– solution de n-bromosuccinimide : 0,5 cm^3.

Agiter et lire l'absorbance à 500 nm 5 min après l'introduction du dernier réactif (la coloration est instable).

3.3.2. Dosage de l'arginine dans M, F et E

Faire un calcul de prise et de dilutions éventuelles sachant que la mélange analysé est à environ 3 g.dm $^{-3}$ en arginine. Soient p la prise et d la dilution.

4. ANALYSE DES RÉSULTATS

4.1. Filtration de la tyrosine

- Tracer la courbe $A_{273\ nm}$ en fonction des volumes cumulatifs des fractions F.
- Analyser l'allure de cette courbe.
- La filtration de la tyrosine est-elle terminée à la fraction n° 15 ?

4.2. Dosage de l'arginine

– Calcul de la concentration en Arginine du mélange initial M

$$C_{Arg} = \frac{x}{pd} 10^{-3}\ g.dm^{-3}$$

– Calcul de la quantité déposée q_1

$$q_1 = C_{Arg}.10^{-3} \text{ mg}$$

– Calcul de la quantité recueillie éventuellement dans F q_2

$$q_2 = C_{Arginine} \text{ dans F x } 100.10^{-3} \text{ mg}$$

– Calcul de la quantité recueillie dans E q_3

$$q_3 = C_{Arginine} \text{ dans E x } 50.10^{-3} \text{ mg}$$

Pour le calcul de q_2 on admettra que la quantité déposée sur la bande de papier Whatmann est négligeable.

4.3. Conclusions

4.3.1. Aspect qualitatif

– Observer les deux bandes révélées et conclure sur la qualité de la séparation.

– Ces conclusions correspondent-elles avec les résultats du dosage de l'arginine dans F ?

4.3.2. Aspect quantitatif

– Calculer le pourcentage global de récupération de l'arginine $\frac{q_2 + q_3}{q_1} \times 100$

– Comment pourrait-on améliorer l'ensemble de ces résultats ?

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Indiquer un autre mode possible d'élution de l'arginine. En discuter les avantages ou les inconvénients par rapport à l'élution par augmentation de force ionique.

Exercice n° 2 :

Sachant que la quantité de résine utilisée est d'environ 10 grammes et que sa capacité maximum d'échange est de 2,4 $mmol.g^{-1}$, vérifier si la quantité utilisée est suffisante dans l'expérience réalisée.

Hidden page

the order of elution of amino acids in the analyser are shown in Table I (this order is not much affected by variations in elution procedure). The following discussion of this elution order, based on the charge properties of the amino acids, is somewhat simplified, since it will not take into account any changes in p*K*a or buffer pH that may occur at normal operating temperatures for the columns (50 °C) or under no ideal solution conditions.

Clearly, the rate of movement of an amino acid in an ion-exchange column depends on the relative distibution of that amino acid between the mobile phase (buffer) and the stationary phase (resin). Thus, for any given buffer and temperature, the rate of elution of an amino acid will be a function of the affinity of that amino acid for both the negatively charged functional groups of the resin and for the hydrophobic, aromatic backbone. Buffer concentration affects affinity by altering the concentration of cation competing with amino acid for the SO_3^- groups. Buffer pH affects affinity by altering the state of ionization of the amino acid : increased positive charge promotes attraction and delays elution, while increased negative charge decreases affinity.

Amino acids are loaded on to the column in pH 2.2 buffer, so that the α-amino groups of all amino acids and the side chains of the basic amino acids will have a full positive charge (Table I). With the exception of the fully ionized first carboxyl of cystine, all α-carboxyls will have net charges of – 0.24 to – 0.75. The sulphonic acid side chain of cysteic acid will have a net charge of – 0.89, but side chain carboxyls will have charges of only – 0.03 (aspartic acid) and – 0.01 (glutamic acid). Thus cysteic acid has a net negative charge (– 0.54) and is rapidly eluted from the column. But all other amino acids will have significant net positive charges (from + 0.3 to + 1.5) and will bind to the resin by ionic interaction with the SO_3^- groups.

In the long column, elution is initiated with pH 3.25 buffer. This does not decrease the positive charge on basic groups significantly, but increases the negative charge on the carboxyl groups. Thus α-carboxyl groups will have net charges of – 0.78 to – 0.97, while side-chain carboxyls will have charges of – 0.29 (aspartic acid) and – 0.09 (glutamic acid). So at pH 3.25, aspartic acid is the only remaining amino acid with a significant net negative charge (– 0.24) and is the next to be eluted. Contrary to statements in some texts, glutamic acid is almost neutral (net charge – 0.01), and is eluted together with neutral amino acids (net charge + 0.03 to + 0.22). Some of the neutral amino acids are more retarded, so that buffer pH is increased to pH 4.25 (Table I), reducing the net charge of the remaining neutral amino acids to + 0.01 or less, and eluting them more rapidly from the column.

Given the very small differences (< 0.04 pH units) in the p*K*a values of the α-carboxyls of the aliphatic amino acids (glycine, alanine, valine, isoleucine and leucine), it is hard to explain their separation based on charge differences alone. From the order of their elution, one is forced to conclude that separation is based on hydrophobic interactions with the resin matrix. The importance of non-ionic interactions has been recognized by Stein and Moore [8], who noted that the elution order of neutral amino acids form sulphonated polystyrene columns (with a hydrophobic matrix) was the reverse of the elution order from starch columns (with a hydrophilic matrix). It is further supported experimentally by absorption studies with highly swollen gels, which suggested the occurence of interactions between the side-chains of neutral amino acids and the resin matrix involving dispersion forces [9].

The basic amino acids still have net positive charge at this pH and are retarded by the resin, but may nonetheless be eluted out at the higher concentrations (0.35 N) of sodium. The amino acid with the most basic side-chain, arginine, is retained the longest by the colum. Althoug the ε-amino group of lysine has a much higher p*K*a than the imidazole side-chain of histidine, the different elution orders of these two amino acids in various systems [2-4] may be rationalized in terms of the relative contributions of ionic interactions (i.e. side-chain p*K*a differences) and non-ionic interactions (e.g. π-π interactions of imidazole side-chain) towards separation in different systems.

Although the importance of non-ionic interactions, in addition to ionic interactions, has yet to be appreciated by many textbook authors, it is a tribute to the early pioneers that, more than 20 years later, ion-exchange chromatography involving sulphonated polystyrene resins and citrate buffers remains the standard method for amino acid separation and quantitation. Moreover, improvements in technology now enable 0.1 nmol of a protein hydrolysate to be analysed in less than one hour [4], compared to the 100-200 nmol and 24 h required originally [1].

RÉFÉRENCES

[1] Spackman, D. H., Stein, W. H. and Moore, S. (1958) *Anal. Chem.* 30, 1190-1206.

[2] Hamilton, P.B. (1966) *Adv. Chromatogr.* 2,3-62.

[3] Blackburn, S. (1968) *Amino Acid Determination*, pp. 1-137, Marcel Dekker, Inc., New York.

[4] Hare, P.E. (1975) in *Protein Sequence Determination* (Needleman, S. B., ed.), pp. 204-231, Springer-Verlag, Berlin.

[5] Moore S., Spackman, D. H. and Stein, W. H. (1958) *Anal. Chem.* 30, 1185-1190.

[6] Meister, A. (1965) *Biochemistry of the Amino Acids*, 2nd edn, Vol. I, p. 28, Academic Press, New York.

[7] Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. and Jones, K.M. (1969) *Data for Biochemical Research*, 2nd edn, p. 18, Oxford University Press, London.

[8] Stein, W. H. and Moore, S. (1948) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 14, 179-190.

[9] Feitelson, J. (1963) *Biochim. Biophys.* Acta 66, 229-236.

[10] Hamilton, P. B. (1963) *Anal. Chem.* 35, 2055-2064.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

Elution par augmentation de pH pour passer de Arg^{2+} à Arg°.

Exercice n° 2 :

Quantité déposée à calculer en fonction des résultats obtenus (environ 0,02 mmole).

Donc large excès de résine puisque la capacité totale de la résine utilisée correspond à 24 mmoles.

La ß-galactosidase (ß-D galactoside galactohydrolase, E.C 3.2.1.23, lactase) d'*Escherichia coli* catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

Ayant une spécificité de substrat large, cette enzyme hydrolyse aussi les ß-galactosides, substrats synthétiques comme l'orthonitrophényl ß-D galactoside (ONPG) ou le paranitrophényl ß-D galactoside (PNPG).

Réaction catalysée en présence d'ONPG :

orthonitrophényl β D-galactoside + H_2O $\xrightarrow{\beta\text{-galactosidase}}$ D-galactose + orthonitrophénol

L'orthonitrophénol (ONP) formé au cours de la réaction d'hydrolyse est jaune en milieu alcalin et présente un maximum d'absorption à 420 nm.

Le but de la manipulation est :
- **de déterminer les paramètres cinétiques (K_M et V_M) de l'enzyme ;**
- **d'étudier l'influence de la concentration en enzyme ;**
- **d'étudier l'influence de la nature du substrat.**

1. PRINCIPE

1.1. Relation entre la vitesse initiale et la concentration en substrat

Pour les réactions enzymatiques à un substrat (rares) ou à deux substrats avec un des substrats en concentration pratiquement constante (fréquents), la courbe Vi = f ($[S]_{initiale}$) est très souvent une branche d'hyperbole d'équation :

$$Vi = \frac{V_M \times [S]_{initiale}}{K_M + [S]_{initiale}}$$

V_M et K_M sont deux constantes cinétiques qui peuvent être déterminées graphiquement pour une concentration donnée en enzyme.

2. RÉACTIFS

- *Tampon phosphate de Na 0,1 mol.dm^{-3}, pH7 :*

Na_2HPO_4, 12 H_2O (masse molaire = 358 g.mol^{-1})	0,06 mol.dm^{-3},	soit 21,48 g.dm^{-3}
NaH_2PO_4, 2 H_2O (masse molaire = 156 g.mol^{-1})	0,04 mol.dm^{-3},	soit 6,24 g.dm^{-3}
KCl (masse molaire = 74,6 g.mol^{-1})	0,01 mol.dm^{-3},	soit 0,746 g.dm^{-3}
$MgCl_2$, $6H_2O$ (masse molaire = 203,31 g.mol^{-1})	10^{-3} mol.dm^{-3},	soit 0,203 g.dm^{-3}
ß mercaptoéthanol	0,05 mol.dm^{-3},	soit 3,55 cm^3
H_2O qsp		1 dm^3
pH7		

- *Solution de ß-galactosidase d'E.coli* à 2 mg de lyophilisat à 600 UI.mg^{-1} dans 1 dm^3 de tampon phosphate 0,1 mol.dm^{-3} pH7 (soit 1,2 UI.cm^{-3}).
- *Solution d'orthonitrophénol* (ONP, masse molaire = 139,11 g.mol^{-1}) à 10^{-3} mol.dm^{-3} en tampon phosphate.
- *Solution de paranitrophénol* (PNP, masse molaire = 139,11 g.mol^{-1}) à 10^{-3} mol.dm^{-3} en tampon phosphate.
- *Solution d'orthonitrophényl-ß-D-galactoside* (ONPG, masse molaire = 301,26 g.mol^{-1}) à 2.10^{-3} mol.dm^{-3} en tampon phosphate pH7.
- *Solution de paranitrophényl-ß-D-galactoside* (PNPG, masse molaire = 301,26 g.mol^{-1}) à 2.10^{-3} mol.dm^{-3} en tampon phosphate pH7.
- *Solution de carbonate de sodium* (Na_2CO_3, masse molaire = 106 g.mol^{-1}) à 1 mol.dm^{-3}.

REMARQUE : utiliser de l'eau distillée (ou bidistillée ou eau de Volvic) pour préparer les solutions, l'eau déminéralisée peut contenir des inhibiteurs de la ß-galactosidase non retenus par les résines échangeuses d'ions.

3. FICHE TECHNIQUE

3.1. Détermination des constantes (K_M) et (V_M) de l'enzyme

3.1.1. Gamme étalon d'orthonitrophénol

Préparer, à partir d'une solution d'orthonitrophénol (ONP) à 10^{-3} mol.dm^{-3}, une gamme contenant de 0 à 1 µmol d'ONP par tube.

Composition du témoin réactif :
- tampon phosphate 0,1 mol.dm^{-3}, pH 7 : 3 cm^{3} ;
- solution de Na_2CO_3 1 mol.dm^{-3} : 1 cm^{3}.

Lire les absorbances à 420 nm.

3.1.2. Détermination des paramètres cinétiques

Préparer 8 tubes à essais en respectant le protocole expérimental du *tableau 25.I*.

Tableau 25.I.

Tubes n°	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
Tampon phosphate 0,1 mol.dm^{-3}. pH7 (cm^{3})	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,4	1,2	1
Solution d'ONPG tamponnée pH7 à 2.10^{-3} mol.dm^{-3} (cm^{3})	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
Préchauffer 5 min à 30 °C								
Solution de ß-galactosidase (cm^{3})	1	1	1	1	1	1	1	1
Incuber à 30 °C pendant 2 min								
Solution de Na_2CO_3 à 1mol.dm^{-3} (cm^{3})	1	1	1	1	1	1	1	1

Lire les absorbances à 420 nm.

3.2. Influence de la concentration en ß-galactosidase sur la vitesse de la réaction enzymatique

Réaliser une série d'essais avec des concentrations croissantes en ß-galactosidase, les autres conditions opératoires étant identiques pour tous les essais (*tabl. 25.II.*).

Tableau 25.II.

Tubes n°	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
Tampon phosphate 0,1 mol.dm^{-3}, pH7 (cm^3)	2	1,95	1,90	1,80	1,60	1,40	1,20	1,00	0,80
Solution d'ONPG tamponnée pH7 à 2.10^{-3} mol.dm^{-3} (cm^3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de ß-galactosidase (cm^3)	0	0,05	0,10	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20
Incuber à 30 °C pendant 2 min									
Solution de Na_2CO_3 à 1mol.dm^{-3} (cm^3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Lire les absorbances à 420 nm.

3.3. Influence de la nature du substrat

Procéder comme en 3.1 mais en présence de paranitrophénol pour la gamme d'étalonnage et de paranitrophényl-ß-D-galactoside pour la détermination des paramètres.

4. RÉSULTATS

4.1. Détermination de K_M et V_M de la ß-galactosidase

4.1.1. Gamme étalon en orthonitrophénol

– Donner le tableau de composition des tubes de la gamme d'étalonnage en ONP.

– Tracer la courbe représentant la variation de l'absorbance à 420 nm en fonction du nombre de micromoles d'ONP présentes dans le milieu réactionnel.

4.1.2. Détermination des paramètres cinétiques de la ß-galactosidase

1) Compléter le *tableau 25.III.*

Tableau 25.III.

[S] = [ONPG] en mol. dm^{-3} dans le milieu réactionnel	
Absorbances à 420 nm	
1/[S] = 1 / [ONPG] en $dm^3.mol^{-1}$	
1 / A	

2) Tracer la courbe 1/A = f(1/[S]).
3) Déterminer graphiquement K_M et V_M.
4) Vérifier si la concentration en substrat [ONPG] = 2.10^{-3} $mol.dm^{-3}$ est saturante.
5) Déterminer l'activité de l'extrait enzymatique en unités internationales/cm^3.

4.2. Influence de la concentration en ß-galactosidase sur la vitesse de la réaction enzymatique

1) Compléter le *tableau 25.IV.*

Tableau 25.IV.

Concentration de la ß-galactosidase en $mg.dm^{-3}$	
A à 420 nm	
µmol ONP libérées par min	

La vitesse maximale V_M déterminée graphiquement est exprimée en A de l'ONP formé par 1 cm^3 de solution enzymatique, après 2 min d'incubation.

Par report de l'absorbance A sur la courbe d'étalonnage élaborée en 3.1.1., on détermine le nombre de µmoles d'ONP formées (soit X µmol).

L'activité de l'enzyme est : X/2 UI.par cm^3 d'enzyme ou : $X/2 \times 10^{-6} \times 1/60 \times 10^3$ $kat.dm^{-3}$ de solution enzymatique.

[S] saturante si ≥ 10 K_M.

5.2. Influence de la concentration en ß-galactosidase sur la vitesse de la réaction enzymatique

Il est conseillé de décaler les apports d'enzyme et de Na_2CO_3 comme indiqué au § 5.1.2.

Par report des absorbances mesurées à 420 nm, sur la courbe d'étalonnage de l'ONP élaborée au § 3.1.1., on détermine le nombre de micromoles d'ONP formées dans le milieu réactionnel par chaque quantité d'enzyme.

Vitesse de réaction exprimée en $\mu mol.min^{-1} = 1/2 \times X_{\mu mol\ d'ONP\ lues\ sur\ la\ courbe}$.

Courbe théorique du nombre de micromoles d'ONP libérées par minute et dans les milieux réactionnels (*tabl. 25.IX.*) : soit une enzyme commerciale à 600 UI par mg. La solution enzymatique est à 2 $mg.dm^{-3}$, soit 1 200 $UI.dm^{-3}$ ou 1,2 UI par cm^3.

Tableau 25.IX.

Solution de ß-galactosidase (cm^3)	0	0,05	0,10	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20
UI théoriques dans les cuves	0	0,060	0,12	0,24	0,48	0,72	0,96	1,2	1,44
ß-galactosidase qm en µg	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2	2,4

Tout écart entre la courbe expérimentale et la courbe théorique peut être dû soit à des erreurs de manipulation, soit à une dégradation de l'enzyme stockée.

L'activité spécifique de l'enzyme en $UI.mg^{-1}$ correspond à la pente de la courbe $\mu mol.min^{-1} = f$ (qm enzyme)

$$= \frac{\Delta \mu mol.min^{-1}}{\Delta \mu g\ d'enzyme} \times 10^3$$



CINÉTIQUE ENZYMATIQUE : LA PHOSPHATASE ALCALINE

SOMMAIRE PAGE

La phosphatase alcaline (E.C.3.1.3.1) catalyse l'hydrolyse des monoesters orthophosphoriques.

Le substrat utilisé pour étudier les paramètres cinétiques de l'enzyme est le paranitrophénylphosphate disodique (PNPP, masse molaire = 371,15 g.mol^{-1}).

Le paranitrophénol (PNP) formé au cours de la réaction d'hydrolyse est jaune en milieu alcalin et présente un pic d'absorption vers 405 nm à pH 9,8.

- ***Réaction catalysée :***

$$O_2N-C_6H_4-O-P(\rightarrow O)(O^-\ Na^+)-O^-\ Na^+ + H_2O \rightarrow O_2N-C_6H_4-O-H + 2\ Na^+\ HPO_4^{2-}$$

paranitrophénylphosphate disodique
PNPP incolore

paranitrophénol = PNP
(jaune en milieu alcalin)

λ_{max} = 405 nm

Le pH optimum de l'enzyme se situe entre pH 9 et pH 10,5.

Pour maintenir le pH constant au cours de la réaction d'hydrolyse, le milieu est tamponné à pH 9,8 par un tampon diéthanolamine (DEA).

La diéthanolamine est un agent transphosphorylant capable de fixer les ions phosphates libérés au cours de la catalyse enzymatique :

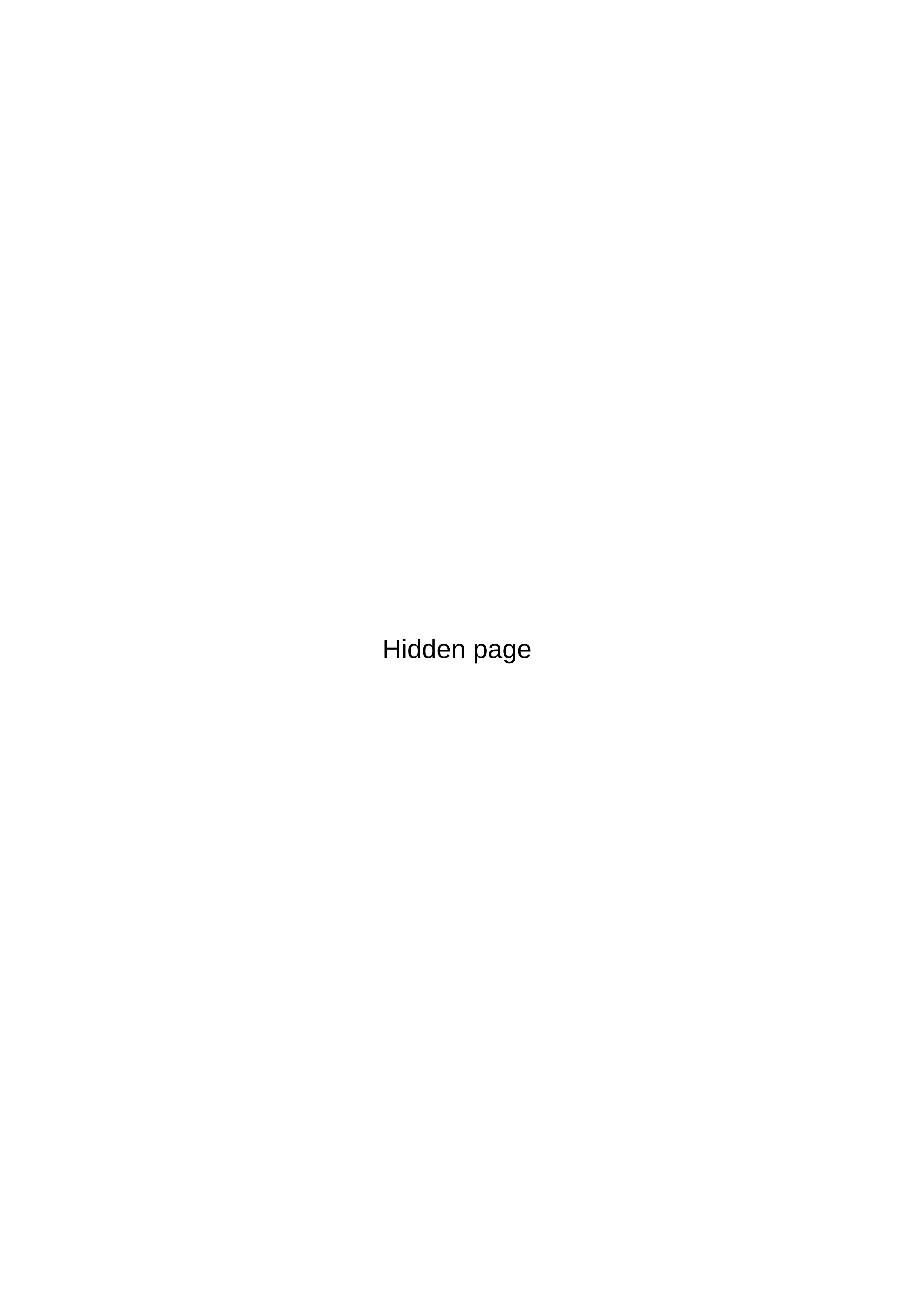
$$\text{PNPP + DEA–OH} \longrightarrow \text{PNP + DEA–O–P}$$

Le substrat introduit non dilué dans le milieu réactionnel est en concentration saturante par rapport à l'enzyme.

D'autres tampons peuvent être également utilisés : Tris-HCl ou glycine-NaOH.

- ***Méthode de mesure de la vitesse de réaction :*** **méthode en continu.**

On suit au spectrophotomètre la formation du produit en fonction du temps : l'absorbance est enregistrée en continu (en manuel ou avec un enregistreur couplé au spectrophotomètre) dans des conditions de vitesse initiale. A = f (t) est une droite.


Hidden page

En appliquant la relation (3) :

- à la température absolue T_1 :

$$\text{Ln } k_{2(T_1)} = \text{Ln } K - \frac{E_A}{RT_1} = \text{Ln } \frac{V_{M(T_1)}}{[E_T]}$$

- à la température absolue T_2 :

$$\text{Ln } k_{2(T_2)} = \text{Ln } K - \frac{E_A}{RT_2} = \text{Ln } \frac{V_{M(T_2)}}{[E_T]}$$

$$\text{Ln } k_{2(T_2)} - \text{Ln } k_{2(T_1)} = \left(\text{Ln } K - \frac{E_A}{RT_2}\right) - \left(\text{Ln } K - \frac{E_A}{RT_1}\right) = \text{Ln } \frac{V_M\ (T_2)}{[E_T]} - \text{Ln } \frac{V_M\ (T_1)}{[E_T]}$$

$$\text{Ln } \frac{k_{2(T_2)}}{k_{2(T_1)}} = \frac{E_A}{RT_1} - \frac{E_A}{RT_2} = \frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) = \frac{E_A}{R}\left(\frac{T_2 - T_1}{T_1 \cdot T_2}\right)$$

$$\text{Ln } \frac{k_{2(T_2)}}{k_{2(T_1)}} = \frac{E_A}{R}\left(\frac{T_2 - T_1}{T_1 \cdot T_2}\right) = \text{Ln } \frac{V_{M(T_2)}}{V_{M(T_1)}}$$

D'où :

$$E_A = R\,\frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \times \text{Ln } \frac{k_{2(T_2)}}{k_{2(T_1)}} = R\,\frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \times \text{Ln } \frac{V_{M(T_2)}}{V_{M(T_1)}}$$

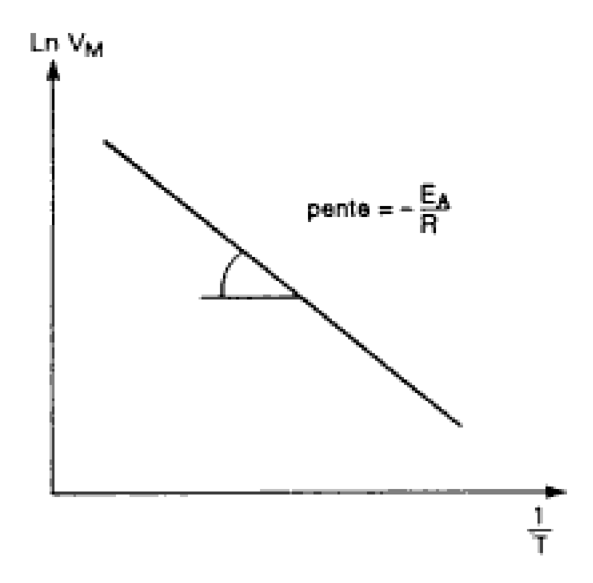


Fig. 26.1. Détermination graphique de E_A

ou encore :

$$E_A = 2{,}303\ R\ \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \times Lg\ \frac{V_{M\,(T_2)}}{V_{M\,(T_1)}}$$

Détermination de E_A par représentation graphique (*fig. 26.1*)

Si la vitesse de réaction est mesurée pour plusieurs températures d'incubation, la relation (3) peut être représentée graphiquement : c'est l'équation d'une droite du type $y = -ax + b$.

$$Ln\ \frac{V_M}{[E_T]} = Ln\ K - \frac{E_A}{RT} = -\frac{E_A}{R} \times \frac{1}{T} + Ln\ K$$

La pente $-\dfrac{E_A}{RT}$ de la courbe $Ln\ \dfrac{V_M}{[E_T]}$ (ou Ln V_M) = f (1/T), permet une détermination graphique de E_A en $kJ.mol_E^{-1}$.

1.1.2. Détermination du Q_{10}

Q_{10} : coefficient d'augmentation de l'activité quand la température d'incubation augmente de 10 °C entre T_1 et T_2.

D'où :

$$E_A = R\ \frac{T_1 \cdot T_2}{10} \times Ln\ \frac{V_{M\,(T_2)}}{V_{M\,(T_1)}}$$

$$\frac{V_{M\,(T_2)}}{V_{M\,(T_1)}} = e^{\frac{E_A}{R} \times \frac{10}{T_1 \cdot T_2}}$$

$$Q_{10} = e^{\frac{E_A}{R} \times \frac{10}{T_1 \cdot T_2}} \quad \text{soit } Ln\ Q_{10} = \frac{10\ E_A}{T_1 \cdot T_2 \cdot R}$$

En général $Q_{10} \approx 2$: la vitesse de réaction est doublée quand la température est augmentée de 10 °C dans un domaine de températures où la dénaturation de l'enzyme n'interfère pas.

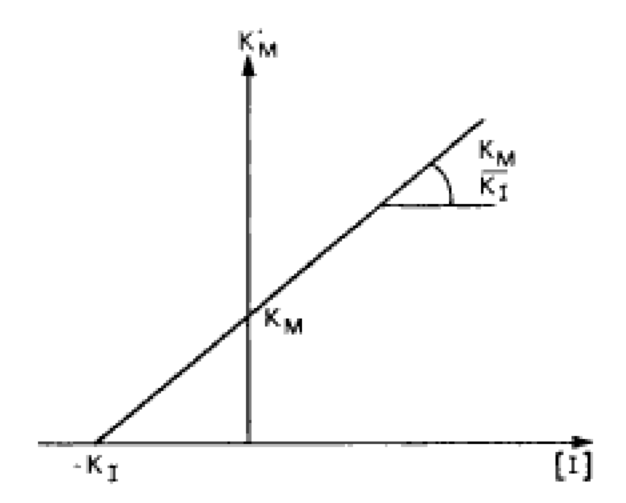


Fig. 26.3. Détermination de K_I

Le plus souvent, les inhibiteurs compétitifs sont des analogues structuraux du substrat. Ils entrent en compétition avec le substrat pour se fixer sur le site actif de l'enzyme.

Dans certains cas, le produit de la réaction enzymatique ressemble suffisamment au substrat pour être lui-même un inhibiteur compétitif de l'enzyme (*fig. 26.4.*).

L'inhibiteur et le substrat sont des analogues structuraux :

E + S ⇌ (1) E.S ⇌ E + P

E + I ⇌ (2) K_I E.I

L'inhibiteur et le substrat ne sont pas des analogues structuraux :

E + S ⇌ (1) E.S ⇌ E + P

E + I ⇌ (2) K_I E.I

Fig. 26.4. Représentations schématiques de l'inhibition compétitive

1.2.2. Inhibition non compétitive

Paramètres cinétiques en présence de l'inhibiteur non compétitif
(*fig. 26.5. et 26.6.*)

K_M est inchangée.
V_M est diminuée.

- *Equation de Michaelis-Menten*

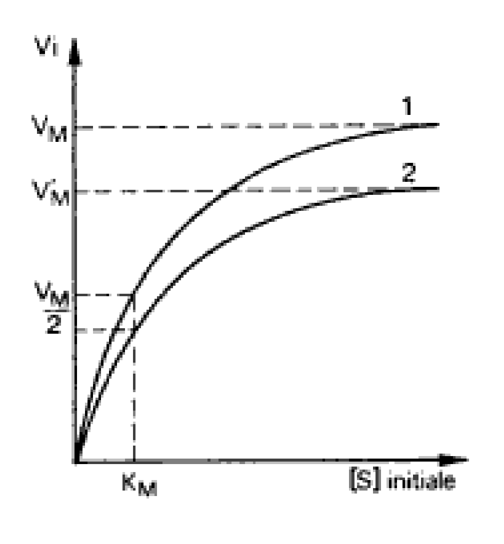
$$Vi = \frac{V_M}{(1 + [I]/K_I)} \times \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{avec } V'_M = \frac{V_M}{(1 + [I]/K_I)}$$

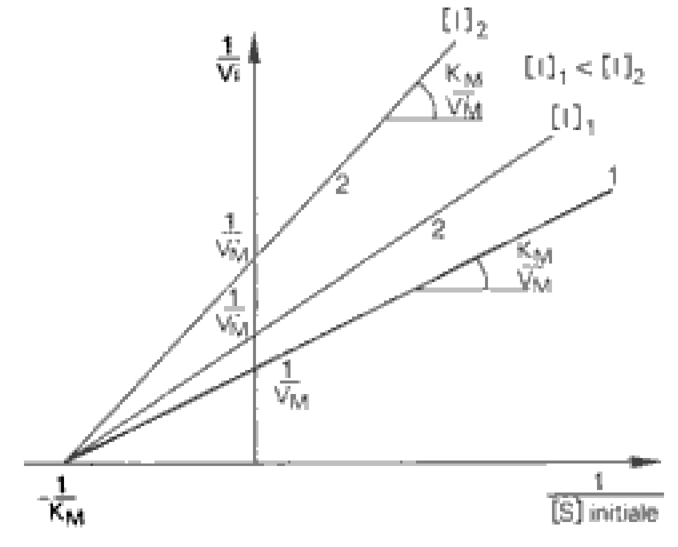
- *Equation de Lineweaver-Burk*

$$\frac{1}{vi} = \frac{K_M}{V'_M} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V'_M}$$

- *Détermination de K_I*

$$\frac{1}{V'_M} = \frac{1}{V_M}(1 + [I]/K_I) = \frac{1}{V_M \cdot K_I}[I] + \frac{1}{V_M}$$





a) Représentations de Michaelis b) Représentations de Lineweaver-Burk

(1) sans inhibiteur ; (2) en présence d'un inhibiteur non compétitif à la concentration [I].

Fig. 26.5. Etude cinétique de l'effet d'un inhibiteur non compétitif

• *Equation de Michaelis-Menten*

$$Vi = \frac{V_M}{(1 + [I]/K_I)} \times \frac{[S]}{\frac{K_M}{(1 + [I]/K_I)} + [S]}$$

$$\text{avec } V'_M = \frac{V_M}{(1 + [I]/K_I)} \text{ et } K'_M = \frac{K_M}{(1 + [I]/K_I)}$$

• *Equation de Lineweaver-Burk*

$$\frac{1}{vi} = \frac{K'_M}{V'_M} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V'_M}$$

D'autre part :

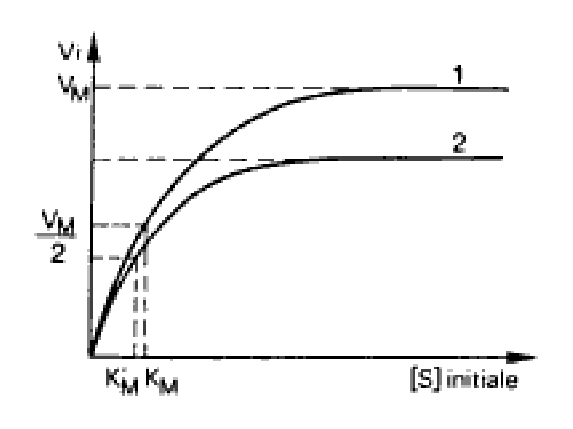
$$\frac{K'_M}{V'_M} = \frac{K_M\,(1 + [I]/K_I)}{V_M\,(1 + [I]/K_I)} = \frac{K_M}{V_M}$$

La pente de la courbe de Lineweaver-Burk n'est pas modifiée par la présence d'un inhibiteur incompétitif.

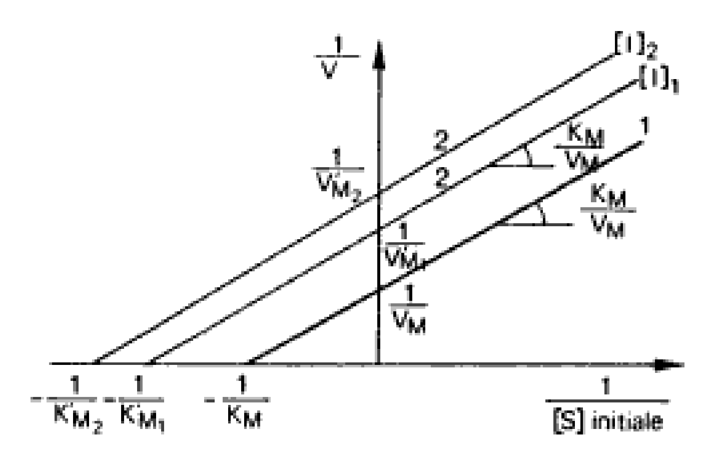
• *Détermination de K_I*

$$\frac{1}{V'_M} = \frac{1}{V_M}(1 + [I]/K_I) = \frac{1}{V_M \cdot K_I}[I] + \frac{1}{V_M}$$

$$\frac{1}{K'_M} = \frac{1}{K_M}(1 + [I]/K_I) = \frac{1}{K_M \cdot K_I}[I] + \frac{1}{K_M}$$



a) Représentations de Michaelis-Menten



b) Représentations de Lineweaver-Burk

(1) sans inhibiteur ; (2) en présence d'un inhibiteur incompétitif à la concentration [I].

Fig. 26.8. Etude cinétique de l'effet d'un inhibiteur incompétitif

2. RÉACTIFS

- *Tampon diéthanolamine* pH = 9,8 (tampon DEA commercialisé prêt à l'emploi) ;
– diéthanolamine à 1 $mol.dm^{-3}$;
– $MgCl_2$ à 0,5 $mmol.dm^{-3}$;
– agent conservateur.

- *Solution de phosphatase alcaline (PAL)* : à partir d'une solution commerciale à 10 $mg.cm^{-3}$, préparer une solution de phosphatase alcaline à 50 µg dans 100 cm^3 d'une solution de sulfate d'ammonium à 50 $g.dm^{-3}$. A conserver dans de la glace fondante (+ 4 °C).

- *Solution de paranitrophénylphosphate disodique* (PNPP ; masse molaire = 371,15 $g.mol^{-1}$) à 5 10^{-2} $mol.dm^{-3}$.

- *Solution de monohydrogénophosphate de sodium* (Na_2HPO_4, 12 H_2O ; masse molaire 358 $g.mol^{-1}$) à 10^{-2} $mol.dm^{-3}$.

- *Solution de L phénylalanine* (masse molaire : 165 $g.mol^{-1}$) à 15 $g.dm^{-3}$; ajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique pour dissoudre, si nécessaire.

3. MODE OPÉRATOIRE

Réglages du spectrophotomètre : utiliser un spectrophotomètre couplé à un enregistreur et permettant une thermorégulation. Choisir un défilement du papier voisin de 60 mm/min et un réglage de l'échelle des absorbances tel que : 100 mm correspondent à A = 1.

Il est également possible de travailler en manuel à la température du laboratoire (sauf § 3.2).

Sélectionner la longueur d'onde : λ = 405 nm.

Utiliser des cuves propres et sèches de 1 cm de trajet optique.

Faire le réglage du zéro sur de l'eau distillée.

3.5. Influence de la présence d'un effecteur : les ions phosphates

Préparer une gamme de dilutions du substrat en tampon pH 9,8 : $1 < d < 50$.

Dans des cuves, introduire les milieux réactionnels suivants :
- substrat dilué : 1 cm^3 ;
- tampon pH 9,8 : 1 cm^3 ;
- solution de Na_2HPO_4 : 1 cm^3.

Déclencher la réaction en ajoutant :
- PAL : 0,5 cm^3.

Pour chaque dilution du substrat, mesurer l'absorbance en fonction du temps.

3.6. Influence de la présence d'un effecteur : la L phénylalanine

Préparer une gamme de dilutions du substrat en tampon pH 9,8 : $1 < d < 50$.

Dans des cuves, introduire les milieux réactionnels suivants :
- substrat dilué : 1 cm^3 ;
- tampon pH 9,8 : 1 cm^3 ;
- solution de L phénylalanine : 1 cm^3.

Déclencher la réaction en ajoutant :
- PAL : 0,5 cm^3.

Pour chaque dilution du substrat, mesurer l'absorbance en fonction du temps.

4. RÉSULTATS

4.1. Courbe : A = f (t)

- Commenter la courbe A = f (t)

- Calculer la vitesse initiale de la réaction étudiée en µmol de PNP formées par minute et par cm^3 ou µg d'enzyme.

4.4. Inhibitions enzymatiques

– Donner sous forme de tableau la réalisation des dilutions du substrat.

– Compléter le tableau de résultats (*tabl. 26.II.*).

Tableau 26.II.

1/[S] $dm^3.mol^{-1}$	
En présence des ions phosphates	
Vi en $\Delta A.min^{-1}$	
1/Vi en $min.\Delta A^{-1}$	
En présence de la phénylalanine	
Vi en $\Delta A.min^{-1}$	
1/Vi en $min.\Delta A^{-1}$	

– Tracer sur une même feuille de papier millimétré les 3 courbes : 1/Vi = f (1/[S]).

– Déterminer les constantes cinétiques K_M en $mol.dm^{-3}$ et V_M en micromoles de PNPP hydrolysées par minute et par cm^3 de solution enzymatique, en absence et en présence des effecteurs.

– Quelles sont les influences des ions phosphates et de la L phénylalanine sur les paramètres cinétiques V_M et K_M de l'enzyme ?

Quel type d'inhibition engendrent-ils ?

– Calculer pour les deux effecteurs étudiés la constante d'inhibition K_i en $mol.dm^{-3}$.

5.4. Inhibitions enzymatiques

5.4.1. *Exemple de tableau de réalisation des dilutions du substrats*

Il faut 3 x 1 cm^3 de chaque dilution pour étudier les effets des inhibiteurs sur la cinétique (*tabl. 26.III.*).

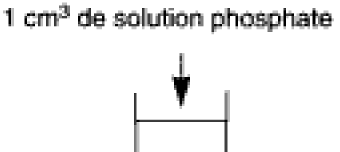
(En raison du prix de revient du tampon DEA, préparer des volumes de dilution inférieurs à 5 cm^3.)

Tableau 26.III.

Coefficient de dilution : 1/d	*1*	*1/2*	*1/4*	*1/8*	*1/14*	*1/20*	*1/28*	*1/40*	*1/50*
Solution de PNPP (cm^3)	3	2	1	0,5	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1
Tampon DEA pH 9,8 (cm^3)	–	2	3	3,5	3,9	3,8	5,4	3,9	4,9
1/[S] initiale dans le milieu réactionnel $dm^3.mol^{-1}$ $[S] = 5.10^{-2} \times 1/d \times 1/3,5$ $1/[S] = d \times 3,5/5.10^{-2} = 70.d$	70	140	280	560	980	1 400	1 960	2 800	3 500

– Homogénéiser puis préparer trois séries de 9 cuves correspondant aux protocoles indiqués sur la *figure 26.11*.







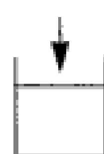


Fig. 26.11.

– Homogénéiser.

– Déclencher la réaction en ajoutant pour chaque essai 0,5 cm^3 d'enzyme.

5.4.2. *Influence des effecteurs*

Les V_M sont déterminés en $\Delta A.min^{-1}$ à partir des courbes $1/Vi = f(1/[S])$ (cf. § 5.1)

$$V_M \text{ en } \mu mol.min^{-1}.cm^{-3} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon \times l} \times 10^6 \times \frac{3,5}{0,5} \times 10^{-3} = 0,378 \times \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Détermination de K_I. Utiliser les relations :

$$K'_M = K_M (1 + [I]/K_I) \quad \text{et} \quad V'_M = \frac{V_M}{(1 + [I]/K_I)}$$

6. EXERCICE

Etude de la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli* (extrait sujet concours général)

1 : détermination de la masse molaire de phosphatase alcaline

On détermine la masse molaire M, de la phosphatase alcaline purifiée par chromatographie d'exclusion-diffusion (tamisage moléculaire) sur une colonne de polydextran (Sephadex G_{200}) tamponnée à pH 7,5 et préalablement étalonnée à l'aide de protéines de masse molaire connue (*tabl. 26.IV.*).

Tableau 26.IV.

Protéines	*Masse molaire g.mol^{-1}*	*Vol. d'élution cm^3*
Cytochrome C	12 400	208
Myoglobine	18 000	194
Ovalbumine	43 000	167
Malate déshydrogénase	60 000	156
Aldolase	145 000	126
Phosphatase alcaline	–	146

– Tracer la courbe d'étalonnage volume d'élution en fonction de log M.

– En déduire la masse molaire de la phosphatase alcaline purifiée.

2 : étude cinétique d'un extrait purifié dilué de phosphatase alcaline

1) *Détermination du coefficient d'absorbance molaire du PNP à 405 nm*

On dispose d'une solution mère de PNP à 5.10^{-3} mol.dm^{-3} de tampon pH 9,8 et on prépare la gamme colorimétrique du *tableau 26.V.*

Tableau 26.IV.

Tubes	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Solution de PNP diluée 100 fois (cm^3)	0	2	4	6	8
Eau distillée (cm^3)	9	7	5	3	1
Tampon pH 9,8 (cm^3)	1	1	1	1	1
Absorbance à 405 nm	0	0,180	0,362	0,539	0,720

– Tracer la courbe représentant la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction de la concentration du PNP exprimée en $mmol.dm^{-3}$.

– Calculer l'absorbance linéique molaire $\varepsilon_{405\ nm}$ du PNP en $dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$ (les lectures d'absorbance sont réalisées en cuves de 1 cm de trajet optique).

2) *Déterminer des paramètres cinétiques de l'extrait enzymatique purifié*

A partir d'une solution mère de PNPP, S_0, à 12,7045 $g.dm^{-3}$ (254,09 $g.mol^{-1}$), on prépare, en tampon pH 9,8, de façon indépendante, les cinq dilutions initiales suivantes :

Dilution au demi	Solution S1
Dilution au dixième	Solution S2
Dilution au vingtième	Solution S3
Dilution au quarantième	Solution S4
Dilution au quatre-vingtième	Solution S5

On dispose d'un spectrophotomètre réglé à 405 nm et équipé d'une thermocuve à 37 °C et d'un enregistreur.

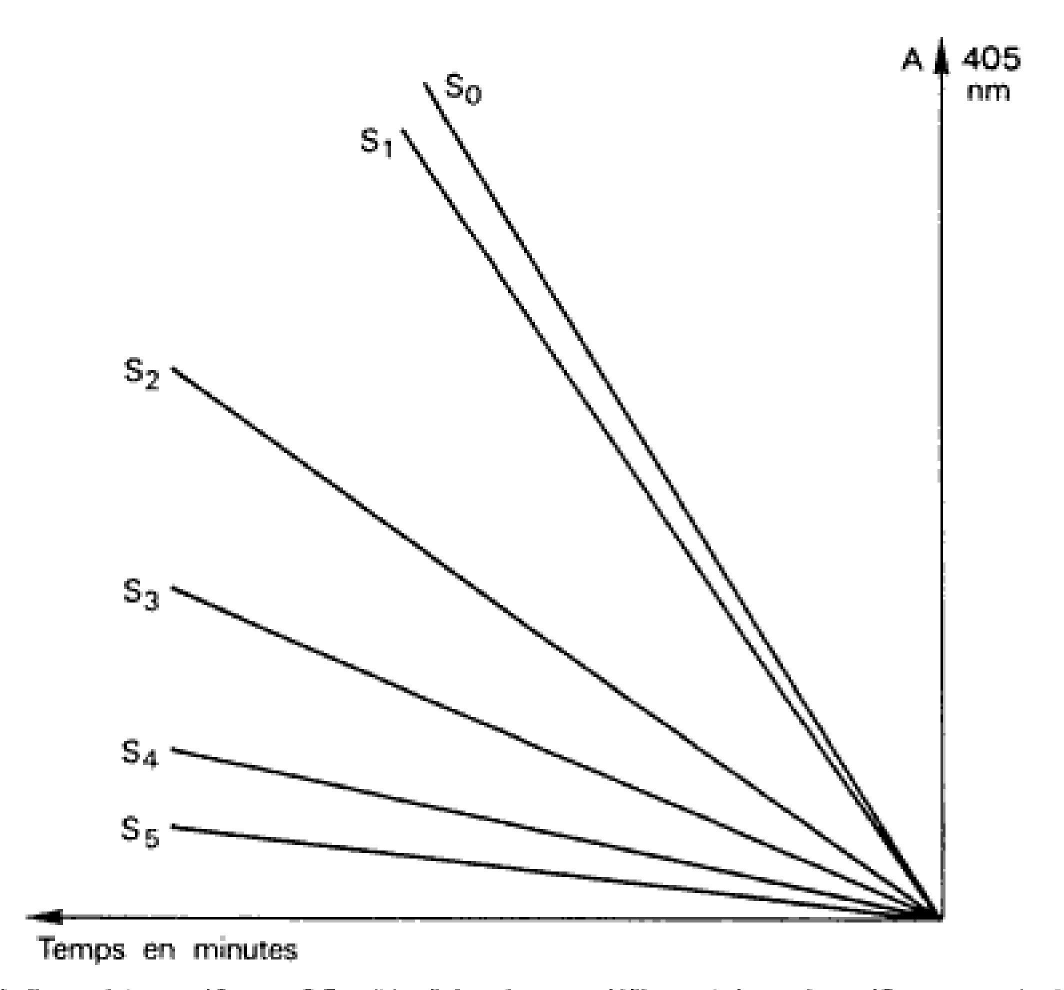
Le protocole de l'étude cinétique est le suivant :
Introduire dans un tube à essais :
– 2 cm^3 de tampon pH 9,8 ;
– 1 cm^3 de solution de PNPP.

Agiter, préincuber 5 min à 37 °C.

Déclencher la réaction par addition de 0,5 cm^3 d'extrait enzymatique.

Enregistrer l'évolution de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps, dans une cuve thermostatée de 1 cm de trajet optique.

Les résultats obtenus pour les six solutions de PNPP (de S_0 à S_5) figurent sur la *figure 26.12*.



Réglages de l'enregistreur : 10 cm = 0,5 unités d'absorbance ; défilement du papier = 40 mm par minute.

Fig. 26.12.

– Définir la vitesse initiale d'une réaction enzymatique et vérifier que les conditions de la mesure de cette vitesse initiale sont bien respectées dans le protocole opératoire.

– Donner l'expression littérale de la vitesse de réaction en $\mu mol.min^{-1}.dm^{-3}$ d'extrait enzymatique en fonction de la variation d'absorbance à 405 nm par minute ($\Delta A.min^{-1}$).

– En utilisant un mode de représentation convenable, déterminer K_M (en $mmol.dm^{-3}$) et V_M (en $\mu mol.min^{-1}.dm^{-3}$) ; quelle est la signification de chacun de ces deux paramètres ?

3) *Calcul de l'activité spécifique, AS, de l'extrait enzymatique purifié*

On introduit dans un matras de minéralisation :
– 10 cm^3 de l'extrait enzymatique ;
– 1 cm^3 d'acide sulfurique concentré ;
– 0,5 g de sulfate de potassium ;
– une pointe de spatule de catalyseur de minéralisation.

On minéralise, puis, après addition d'un excès d'hydroxyde de sodium, le minéralisat est distillé et l'ammoniac est recueilli dans 20 cm^3 de solution aqueuse d'acide sulfurique à 0,0110 $mol.dm^{-3}$ (à 1 % près) ; l'excès d'acide est titré par 17,85 cm^3 d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium.

– Calculer la concentration protéique de l'extrait enzymatique.

– En déduire l'activité spécifique, AS, en $nkat.mg^{-1}$ de protéine.

Données :

Réalisation d'un témoin : $E_{H_2SO_4} = 10\ cm^3$ $V_{NaOH} = 12,50\ cm^3$;

$M_N = 14\ g.mol^{-1}$;

la teneur moyenne en azote des protéines est de 16 % ;
la phosphatase alcaline est le seul constituant azoté de l'extrait enzymatique.

4) *Etude de deux effecteurs inhibiteurs de la phosphatase alcaline*

– *Na_2HPO_4*

Protocole opératoire :

– 1 cm^3 de tampon pH 9,8 ;
– 1 cm^3 solution Na_2HPO_4 (2 $mmol.dm^{-3}$) ;
– 1 cm^3 solution PNPP ;
– agiter ; préincuber 5 min à 37 °C ;
– déclencher la réaction par addition de 0,5 cm^3 d'extrait enzymatique E ;
– enregistrer l'évolution de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps en cuve de 1 cm de trajet optique.

Résultats (*tableau 26.VI.*)

Tableau 26.VI.

Concentrations en PNPP initiales	*S2*	*S3*	*S4*	*S5*
$\Delta A.min^{-1}$	0,130	0,076	0,041	0,022

– *L phénylalanine*

Protocole opératoire :

– 1 cm^3 de tampon pH 9,8 ;
– 1 cm^3 solution L phénylalanine (2 $mmol.dm^{-3}$) ;
– 1 cm^3 solution PNPP ;
– agiter ; préincuber 5 min à 37 °C ;
– déclencher la réaction par addition de 0,5 cm^3 d'extrait enzymatique E ;
– enregistrer l'évolution de l'absorbance, à 405 nm, en fonction du temps, en cuve de 1 cm de trajet optique.

Résultats (*tableau 26.VII.*)

Tableau 26.VII.

Concentrations en PNPP initiales	*S2*	*S3*	*S4*	*S5*
$\Delta A.min^{-1}$	0,055	0,044	0,031	0,020

La concentration catalytique (catc) de l'extrait enzymatique en µkat.dm^{-3} d'extrait enzymatique s'exprime, en fonction des données expérimentales, sous la forme suivante :
- méthode « deux points » catc (µkat.dm^{-3}) = K.$A_{essai\ 30\ min}$;
- méthode cinétique optimisée catc (µkat.dm^{-3}) = K'.ΔA.min^{-1}.

Calculer K et K'.

CORRECTION DE L'EXERCICE

1 :

Masse molaire de l'enzyme : ≈ 80 000 g.mol^{-1}.

2 : étude cinétique d'un extrait purifié dilué de phosphatase alcaline.

1) Détermination du coefficient d'absorbance molaire du PNP à 405 nm :

Concentration du PNP en mmol.dm^{-3} dans les tubes : 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04.

$$\varepsilon_{405} \text{ du PNP} = \frac{A}{C_{PNP} \text{ en mmol.dm}^{-3}} \times 10^3 = 18\,000 \text{ dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

2) Paramètres cinétiques de l'extrait enzymatique (tabl. 26.IX) :

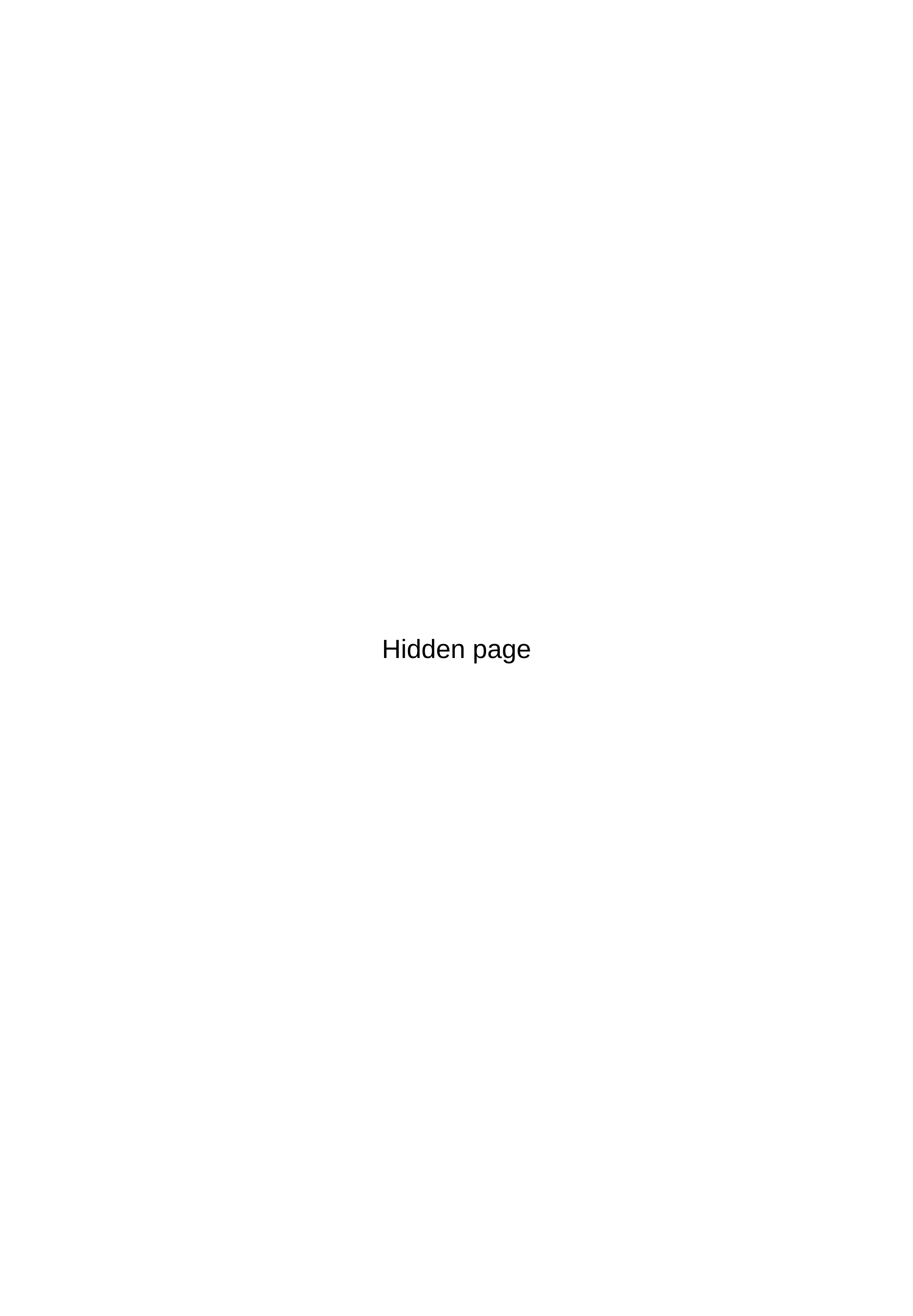
$$\text{Solution mère de PNPP} = \frac{12{,}7045}{254{,}09} = 0{,}05 \text{ mol.dm}^{-3}$$

Tableau 26.IX.

1/[S] dm^3.mol^{-1} (= 1/0,05 x d x 3,5 = 70 d)	70	140	700	1 400	2 800	5 600
Vi = ΔA.min^{-1}	0,315	0,285	0,140	0,085	0,045	0,025
1/Vi (min.ΔA^{-1})	3,17	3,51	7,14	11,76	22,2	40

K_M = 0,0025 mol.dm^{-3} soit 2,5 mmol.dm^{-3}

$$V_M\ (\Delta A.\text{min}^{-1}) = 0{,}4 \quad V_M = \Delta A.\text{min}^{-1} \times \frac{1}{\varepsilon.l} \times 10^6\ \frac{3{,}5}{0{,}5} = 389\ \frac{\Delta A}{\Delta t} = 156\ \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{dm}^{-3}$$


Hidden page



ß-GALACTOSIDASE IMMOBILISÉE

SOMMAIRE PAGE

Le ß-galactosidase (E.C. 3.2.1.23, lactase) est une enzyme utilisée dans l'industrie laitière pour hydrolyser le lactose, diholoside de goût peu sucré, peu digeste, peu sobluble dans l'eau, en un mélange de glucose et de galactose plus performant au niveau nutritif et gustatif.

Le but de la manipulation est de comparer les caractéristiques cinétiques de la ß-galactosidase (K_M, V_M, pH optimum), en solution et immobilisée.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **détermination graphique des paramètres cinétiques d'une enzyme ;**
- **notion de pH optimum ;**
- **enzyme immobilisée ;**
- **principales méthodes d'immobilisation d'une enzyme ;**
- **propriétés des enzymes immobilisées.**

1. PRINCIPE

1.1. Préparation de l'enzyme immobilisée : la ß-galactosidase

Les enzymes peuvent être immobilisées *(fig. 27.1.)* :
– soit par fixation sur un support insoluble (adsorption, liaisons ioniques ou liaisons covalentes) ;
– soit par inclusion dans un gel ou une membrane ;
– soit par réticulation : les molécules d'enzyme sont reliées les unes aux autres par des liaisons covalentes, qui doivent épargner le site actif.

2. RÉACTIFS

- *Tampon phosphate* (sel de potassium) 0,100 mol.dm^{-3}, pH 7,2, contient du sulfate de magnésium ($MgSO_4$) à 1 mmol.dm^{-3}.
- *Solution aqueuse de para-nitrophényl–ß–D–galactoside* à 2.10^{-2} mol.dm^{-3}.
- *Solution de ß-galactosidase de Escherichia coli* (préparation commerciale diluée 500 fois : Boehringer réf. 105 031).
- *Solution de carbonate de potassium* à 1 mol.dm^{-3}.
- *Solution de gélatine à 5 %* dans le tampon phosphate pH 7,2. Maintenir cette solution à 45 °C (liquide).
- *Solution de glutaraldéhyde à 2 %* à préparer extemporanément par dilution en tampon phosphate pH 7,2 à partir de la solution à 25 %.
- *Tampon universel : citrate-phosphate-borate 0,02857 mol.dm^{-3}* : 2,0 ≤ pH ≤ 12.

Préparation des solutions tampons *(tabl. 27.I.)* (4,5 ≤ pH ≤ 9,0) à partir de deux solutions mères A et B en respectant la composition suivante : 100 cm^3 de A + x cm^3 de B.

Solution mère A :
- Acide borique ($HB(OH)_4$) : 1,767 g ;
- Acide citrique monohydraté ($C_6H_8O_7$, H_2O) : 6,004 g ;
- Véronal acide (barbital) : 5,236 g ;
- Phosphate monopotassique (KH_2PO_4) : 3,888 g ;
- H_2O : q s p : 1 000 cm^3.

Solution mère B : hydroxyde de sodium à 0,2 mol.dm^{-3}.

Tableau 27.I.

PH des solutions tampons	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
x cm^3 de B (20 °C)	20,8	26,3	32,2	38,3	44,5	50,9	57	62,8	68,2	73,2

Vérifier au pHmètre et éventuellement ajuster avec de la solution A ou B.

Remarque : utiliser de l'eau distillée ou bidistillée ou de l'eau de Volvic pour préparer les solutions : l'eau déminéralisée peut contenir des inhibiteurs de la ß-galactosidase non retenus par les résines échangeuses d'ions.

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Détermination des paramètres cinétiques K_M et V_M de la ß-galactosidase

3.1.1. ß-galactosidase soluble

Préparer 8 tubes à essais en respectant le protocole expérimental du *tableau 27.II.*

Tableau 27.II.

Tubes n°	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
Solution de PNPG à 2.10^{-2} mol.dm^{-3} (cm^3)	0	0,010	0,015	0,020	0,050	0,100	0,200	0,300
Tampon phosphate 0,1 mol.dm^{-3}, pH 7,2 (cm^3)	1	0,990	0,985	0,980	0,950	0,900	0,800	0,700
Préchauffer 5 minutes à 30 °C								
Solution de ß-galactosidase (cm^3)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Incuber à 30 °C pendant exactement 5 minutes								
Solution de K_2CO_3 (cm^3) à 1mol.dm^{-3}	2	2	2	2	2	2	2	2

Lire les absorbances à 405 nm contre le témoin réactif.

3.1.2. ß-galactosidase immobilisée

Immobilisation de l'enzyme

Dans 6 fioles à usage unique, introduire dans l'ordre :
- solution de ß-galactosidase : 0,4 cm^3 ;
- gélatine : 1 cm^3 ;
- glutaraldéhyde à 2 % : 0,5 cm^3.

Agiter doucement le mélange. Eliminer, dans la mesure du possible, les bulles d'air en les perçant à l'aide d'une aiguille.

Placer les fioles à + 4 °C (glace fondante) pendant 10 minutes.

Sortir les fioles de la glace et laisser la réaction de pontage se développer à température ambiante pendant 15 minutes.

Rincer soigneusement la surface du gel et les parois de la fiole avec 2 fois 5 cm^3 de tampon phosphate pH 7.

Egoutter les fioles puis les mettre au bain thermostaté à 30 °C pendant 5 minutes pour permettre l'équilibrage de température.

Détermination de K_M et V_M

Dans les 6 fioles préparées au paragraphe précédent et maintenues à 30 °C, ajouter ce qui est indiqué dans le tableau 27.III.

Tableau 27.III.

Fioles n°	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
Tampon phosphate à 0,1 $mol.dm^{-3}$ pH 7,2 (cm^3)	1,00	0,90	0,75	0,50	0,25	0,00
Laisser la température se stabiliser pendant 5 minutes						
Solution de PNPG à 2.10^{-2} $mol.dm^{-3}$ (cm^3)	0	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00
Incuber à 30 °C pendant exactement 5 minutes Agiter fréquemment les fioles						
Solution de K_2CO_3 (cm^3) à 1$mol.dm^{-3}$	2	2	2	2	2	2

Laisser les fioles 15 minutes supplémentaires à 30 °C. Agitez-les de temps à autre.

Lire les absorbances à 405 nm contre un témoin.

3.2. Influence du pH

3.2.1. Influence du pH sur l'activité de la ß-galactosidase soluble

Réaliser 10 essais aux pH 4,5 ; 5,0 ; 5,5 ; 6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5 ; 8,0 ; 8,5 ; 9,0 en présence d'une concentration de substrat saturante : [S] = 4.10^{-3} $mol.dm^{-3}$.

Arrêter la réaction enzymatique après 5 minutes d'incubation à 30 °C.

Lire les absorbances à 405 nm contre l'air.

3.2.2. Influence du pH sur l'activité de la ß-galactosidase immobilisée

Traiter comme § 3.1.2., 10 fioles contenant :

- 0,4 cm^3 de solution enzymatique ;
- 1 cm^3 de gélatine ;
- 0,5 cm^3 de glutaraldéhyde à 2 %.

4.2. Influence du pH

– Tracer pour les deux enzymes les courbes :

$$A = f\,(pH) \quad et \quad \frac{A}{A\,max} \times 100 = f\,(pH)$$

– Déterminer le pH optimum de l'enzyme dans les deux cas.
Comparer les courbes représentant le % de l'activité maximale de l'enzyme libre et immobilisée en fonction du pH et commenter les résultats.

Données : dans les conditions opératoires choisies, le coefficient spécifique d'absorbance molaire du para-nitrophénol à 405 nm est égal à 18 500 $dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$.

5. TECHNIQUE

5.1. Détermination des paramètres cinétiques K_M et V_M de la ß-galactosidase

La méthode de dosage étant une méthode « 2 points », il est important de décaler dans le temps l'apport de l'enzyme et donc du carbonate de potassium (cf. chapitres 18 et 25).

5.1.1. ß-galactosidase soluble

Le volume réactionnel pour l'incubation est de 1,1 cm^3.

Calcul de 1 / [PNPG] $dm^3.mol^{-1}$ dans le milieu d'incubation *(tabl. 27.IV.)*.

Tableau 27.IV.

Coefficient de dilution (1/d) de la solution de PNPG à 2.10^{-2} $mol.dm^{-3}$	$\frac{0,010}{1,1}$	$\frac{0,015}{1,1}$	$\frac{0,020}{1,1}$	$\frac{0,050}{1,1}$	$\frac{0,100}{1,1}$	$\frac{0,200}{1,1}$	$\frac{0,300}{1,1}$
1 / [PNPG] $dm^3 . mol^{-1}$	5 500	3 667	2 750	1 100	550	275	183

Exemple : calcul de 1 / [PNPG] $dm^3.mol^{-1}$ pour le tube n° 1 :

$$\frac{1,1}{0,01} \times \frac{1}{2.10^{-2}}$$

Tracer la courbe : 1 / A = 1 / [PNPG].

Pour les déterminations graphiques de K_M ($mol.dm^{-3}$) et V_M (A_{max}), se reporter au chapitre 25.

V_M de l'enzyme en micromoles de PNPG hydrolysées par minute et par cm^3 de solution enzymatique :

$$V_M = \frac{A_{max}}{\varepsilon_{405\,nm}\ PNP} \times 10^6 \times \frac{1}{5} \times \frac{3,1}{0,1} = 335\ A_{max}$$

5.1.2. ß-galactosidase immobilisée

Le volume réactionnel pour l'incubation est de 2,9 cm^3.

Calcul de 1 / [PNPG] $dm^3.mol^{-1}$ dans le milieu d'incubation *(tabl. 27.V.)*.

Tableau 27.V.

Coefficient de dilution (1/d) de la solution de PNPG à 2.10^{-2} $mol.dm^{-3}$	$\frac{0,10}{2,9}$	$\frac{0,25}{2,9}$	$\frac{0,50}{2,9}$	$\frac{0,75}{2,9}$	$\frac{1,00}{2,9}$
1 / [PNPG] $dm^3.mol^{-1}$	1 450	580	290	193	145

Exemple : calcul de 1 / [PNPG] $dm^3.mol^{-1}$ pour le tube n° 1 :

$$\frac{2,9}{0,1} \times \frac{1}{2.10^{-2}}$$

Tracer la courbe : 1/A = 1/[PNPG].

Déterminer graphiquement K_M apparent ($mol.dm^{-3}$) et V_M apparent (A_{max}).

V_M de l'enzyme en micromoles de PNPG hydrolysées par minute et par cm^3 de solution enzymatique :

$$V_M = \frac{A_{max}}{\varepsilon_{405\,nm}\ PNP} \times 10^6 \times \frac{1}{5} \times \frac{4,9}{0,4} = 132\ A_{max}$$

Le but de cette manipulation est :
• de mettre en évidence les facteurs expérimentaux intervenant dans la détermination d'une activité enzymatique et d'en déduire les notions de méthode standardisée ;
• d'utiliser un coffret proposé par un fabricant pour la détermination transaminasique d'un sérum (ASAT) et d'en discuter la composition ;
• d'exprimer les résultats dans différents systèmes d'unités.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **vitesse initiale ;**
- **méthode standardisée et méthode optimisée ;**
- **test optique ;**
- **méthode en biréactif ;**
- **réactif déclanchant ;**
- **valeur usuelle.**

1. PRINCIPE

L'activité catalytique d'une enzyme est exprimée par la vitesse de la réaction qu'elle catalyse dans des conditions expérimentales précises. Le résultat est rapporté à une expression de *quantité* de produit apparu ou de substrat disparu par unité de temps. Dans les méthodes en cinétique, on suit constamment l'évolution de la réaction en fonction du temps (par opposition aux méthodes en deux points). Les tests optiques par absorption moléculaire sont donc les plus fréquents et plus particulièrement le test optique en UV utilisant le couple $NAD(P)^+$ / NAD(P)H.

Ces méthodes, facilement automatisables, permettent de vérifier que la vitesse est constante pendant la mesure.

Les conditions opératoires sont *standardisées* pour qu'on mesure une vitesse maximum V_M sachant que $V_M = kcat\ (E_T)$:
– $(S) \geq 10\ K_M$ pour tous les substrats y compris les coenzymes pyridiniques (à condition qu'un excès de substrat ne soit pas inhibiteur) ;
– durée d'incubation brève ;
– pH voisin de la zone de pH optimum et choix d'un tampon dont les constituants chimiques ne sont pas inhibiteurs ;

On appliquera cette technique à la détermination de l'activité aspartate aminotransférasique d'un sérum.

Résumé de la manipulation
- 1er temps : lire et analyser la notice du coffret.
- 2e temps : reconstituer les réactifs.
- 3e temps : réaliser le dosage en suivant la fiche technique.
- 4e temps : exprimer et contrôler les résultats.

2. MATÉRIEL ET PRODUITS

- Spectrophotomètre à cuve thermostatée (si possible spectrophotomètre avec enregistreur ou informatisé).
- Micropipettes automatiques.
- Cuves à usage unique.
- Sérum à analyser (respecter les précautions*).
- Sérum de contrôle normal ou pathologique.
- Coffret pour dosage de l'ASAT. Par exemple :
  - Biomérieux 63250 ;
  - Roche 0714062 ;
  - Bœhringer 195707 ;
  - Merck 14344
  - Biotrol A 03013.

* A manipuler avec gants. A pipeter avec système d'aspiration.

3. MANIPULATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS

Etude pratique d'un coffret du commerce pour la détermination de la concentration catalytique de l'aspartate aminotransférase sérique E.C.2.6.1.1. (ASAT).

On peut choisir :
– soit d'étudier et d'utiliser une seule marque de coffret ;
– soit de travailler par groupe et de comparer les conditions réalisées dans la cuve de mesure et les résultats expérimentaux.

L'exemple proposé ici concerne l'utilisation d'un coffret Biomérieux.

Pour information, les propositions de standardisation de l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) pour le dosage de l'ASAT plasmatique sont :
– température : 30 °C
– pH : 7,8
– tampon tris aminométhane : 80 mmol.dm $^{-3}$
– 2-oxoglutarate : 12 mmol.dm $^{-3}$
– L aspartate : 200 mmol.dm $^{-3}$
– NADH : 0,18 mmol.dm $^{-3}$
– pyridoxal phosphate : 0,11 mmol.dm $^{-3}$
– malate déshydrogénase (MDH) : 600 U.dm $^{-3}$
– lactate déshydrogénase : 900 U.dm $^{-3}$

(de tampon tris aminométhane à lactate déshydrogénase : } concentration dans la cuve)

– rapport de dilution de l'échantillon : 1/12

Données :
K_M ASAT/aspartate : 1.10 $^{-4}$ mol.dm $^{-3}$;
K_M ASAT/2-oxoglutarate : 5.10 $^{-4}$ mol.dm $^{-3}$;
K_M MDH/oxaloacétate : 4.10 $^{-5}$ mol.dm $^{-3}$;
K_M MDH/NADH : 4.10 $^{-5}$ mol.dm $^{-3}$.

3.1. Etude de la fiche technique

1) Comparer les conditions opératoires préconisées pour la standardisation et celles choisies par le fabricant.

2) Discuter :
– les concentrations en aspartate et 2-oxoglutarate par rapport aux K_M de l'ASAT ;
– la concentration en NADH ;
– le rôle de la LDH ;
– le rôle du pyridoxal 5' phosphate ;
– l'activité de la malate déshydrogénase ;
– l'intérêt pour ce dosage d'utiliser une méthode « biréactifs » avec réactif déclenchant.

3) Démontrer les formules de calcul indiquées sur la fiche sachant qu'à pH 7,8 les absorbances linéiques molaires du NADH sont de :
– $6{,}18\ 10^3\ dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$ à 334 nm ;
– $6{,}30\ 10^3\ dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$ à 340 nm ;
– $3{,}40\ 10^3\ dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$ à 365 nm.

3.2. Détermination de l'activité aspartate aminotransférasique d'un sérum

- Reconstituer le réactif.

- Suivre le mode opératoire proposé en respectant la thermostatisation.

- Lire la diminution d'absorbance par rapport à l'air pendant 2 à 3 minutes.

Suivant l'appareillage dont on dispose, on peut :
– soit enregistrer directement la courbe et calculer le coefficient directeur $\Delta A_{340\ nm.min^{-1}}$;
– soit noter l'absorbance toutes les 15 secondes, tracer la courbe et calculer le coefficient directeur ;
– soit utiliser un spectrophotomètre informatisé qui fournit directement le résultat.

- Bien contrôler la limite de linéarité et éventuellement recommencer après avoir dilué le sérum.

Calculer la valeur de l'activité enzymatique du sérum analysé dans les deux systèmes d'unités proposés sur la fiche. La valeur est-elle usuelle ou le sérum est-il pathologique ? Dans ce cas, ce résultat permet-il d'émettre une hypothèse de diagnostic médical ?

3.3. Extensions possibles de la manipulation

1) Faire une expérience en parallèle avec un sérum de contrôle qui permettra de vérifier notamment l'exactitude de l'absorbance délivrée à 340 nm par le spectrophotomètre (voir chapitre 9) et la validité de la thermostatisation. Conclure.

2) Recommencer l'expérience à une température légèrement différente de 30 °C (25 °C, 32 °C, 37 °C suivant l'appareillage dont on dispose). Commenter le résultat expérimental obtenu. Dans la littérature, le facteur de correction proposé est de 1,45 lorsque l'on passe de 30 °C à 37 °C.

3) Poursuivre une expérience au-delà de trois minutes pour déceler le temps au bout duquel la réaction n'est plus d'ordre 0 par rapport à (S).

4) Faire une analyse statistique des résultats obtenus avec le groupe. Calculer l'écart-type σ et le coefficient de variation CV. Rechercher les causes d'erreurs aléatoires et d'erreurs systématiques.

Enzyline® ASAT / GOT standardisé unitaire

Détermination cinétique de l'activité aspartate aminotransférase (IFCC/SFBC)

Réf. 6 325 0 Coffret pour 18 déterminations
R1 = 1 × 50 ml
R2 = 18 × 2 ml (lyophilisé)
R3 = 2 × 2,5 ml

Méthode recommandée par l'IFCC et la SFBC.
A l'exception de la température, les mêmes conditions de réaction sont recommandées par la Société Suisse de Chimie Clinique (SSCC-SGKC).

PRINCIPE

Détermination cinétique de l'activité GOT après la réactivation de l'apoenzyme par le pyridoxal-5' phosphate selon la réaction :

$$\text{L-aspartate} + \text{2-oxo-glutarate} \underset{}{\overset{GOT}{\rightleftharpoons}} \text{oxalo-acétate} + \text{L-glutamate}$$

$$\text{Oxaloacétate} + NADH + H^+ \overset{MDH}{\rightleftharpoons} \text{L-malate} + NAD^+$$

GOT = transaminase glutamique oxaloacétique.
MDH = malate déshydrogénase.

Valeurs usuelles dans le sérum à 30°C (IFCC / SFBC) :

Hommes, enfants et adolescents de 4 à 20 ans :
100-500 nKat × l^{-1} (6-30 U/l).

Femmes : 100-400 nKat × l^{-1} (6-25 U/l).

Valeurs usuelles dans le sérum à 37°C (SSCC-SGKC) :

Hommes : 200-800 nKat × l^{-1} (14-50 U/l).

Femmes : 200-500 nKat × l^{-1} (11-32 U/l).

Bibliographie :

1. Ann. Biol. Clin. 1976, **34**, 291-302.
2. Ann. Biol. Clin. 1982, **40**, 91-98.
3. I.S.B. 1984, **10**, (n° 1), 31-35.

RÉACTIFS

Concentration dans le test :

Réactif 1 tampon aspartate	tampon tris pH 7,8	80 mmol × l^{-1}
	L-aspartate	200 mmol × l^{-1}
	NADH	0,18 mmol × l^{-1}
Réactif 2 enzymes-coenzymes	pyridoxal-5' phosphate	0,1 mmol × l^{-1}
	malate déshydrogénase	10 µKat × l^{-1}
	lactate déshydrogénase	15 µKat × l^{-1}
Réactif 3 2-oxoglutarate	2-oxoglutarate	12 mmol × l^{-1}

Stabilité :

La stabilité des réactifs à 2-8°C est indiquée sur chaque conditionnement.

ÉCHANTILLONS

Sérum ou plasma hépariné.
Hémolyse gênante.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation du réactif :

Reprendre un flacon de Réactif 2 par 2 ml de Réactif 1.

Stabilité : – 24 heures à 20-25°C
– 5 jours à 2-8°C

Longueur d'onde : 340 nm (Hg 334 – Hg 365)
Température : 30°C
Cuve : trajet optique 1 cm
Zéro de l'appareil : air ou eau distillée

Dans un flacon de Réactif 2 repris et porté à 30°C, ajouter :	
Echantillon	200 µl
Mélanger, incuber 10 min à 30°C, ajouter :	
R3	200 µl
Mélanger, introduire dans la cuve à 30°C, attendre 1 min. Mesurer la diminution moyenne de DO par min (n) pendant 1 à 3 min.	

Linéarité :

Pour une variation moyenne de DO par min ≥ 0,15, refaire la détermination en diluant l'échantillon au 1/5 ou 1/10 dans une solution de NaCl 9 g/l.

Calcul :

340 nm U/l = n × 1 905
nKat × l^{-1} = n × 31 750

334 nm U/l = n × 1 942
nKat × l^{-1} = n × 32 370

365 nm U/l = n × 3 529
nKat × l^{-1} = n × 58 823

NOTE

Adaptations sur appareils automatiques disponibles sur demande.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Exactitude et reproductibilité :

Zymotrol, Unitrol.

Reproductibilité :

Unitrol « X ».



Fig. 28.1.

4. EXERCICES

Exercice n° 1 :

L'absorbance linéique molaire du NADH est exprimée dans des unités différentes selon les documents utilisés. Sachant que ε_M à 340 nm est égal à 6.10^3 $dm^3.cm^{-1}.mol^{-1}$, exprimer cette valeur en $cm^2.mol^{-1}$ et en $m^2.mol^{-1}$.

Exercice n° 2 :

Dans les techniques enzymatiques utilisant une consommation de NADH, les fabricants de coffrets proposent souvent une concentration initiale en NADH de 0,18 $mmol.dm^{-3}$ dans le milieu réactionnel, quelles que soient les K_M du NADH vis-à-vis des enzymes utilisés. Pourquoi ?

Exercice n° 3 :

Analyser les avantages et les inconvénients à utiliser comme température de standardisation 25 °C, 30 °C ou 37 °C. La durée de la mesure est-elle importante suivant la température choisie ?

Exercice n° 4 :

La fiche technique indique une possibilité de mesurer les absorbances à 334 nm ou 365 nm. Quel type de spectrophotomètre utilise-t-on dans ce cas ?

Exercice n° 5 :

Le mode opératoire préconise l'utilisation d'un sérum ou d'un *plasma hépariné* : pourquoi ?

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

ε_M de NADH à 340 nm = 630 $m^2.mol^{-1}$ ou 6,3.10^6 $cm^2.mol^{-1}$.

Exercice n° 2 :

Absorbance initiale d'environ 1,20 à ne pas dépaser pour certains spectrophotomètres.

Exercice n° 3 :

- à 25 °C : thermostatisation difficile à réaliser en fonction de la température ambiante ;
- à 30 °C : stabilité de l'enzyme ;
- à 37 °C : température trop élevée pour certains enzymes.

En fonction de la température, la période où la vitesse est constante est de durée variable.

Exercice n° 4 :

Spectrophotomètre à lampe de vapeur de mercure.

Exercice n° 5 :

Cet anticoagulant est une macromolécule qui présente de nombreux avantages : pas de modification notoire de la pression osmotique ni de la composition ionique du milieu.

Le but de cette manipulation est :
• de dégager les conditions expérimentales à respecter pour doser un substrat enzymatiquement par méthode en point final ;
• d'utiliser deux tests différents : test colorimétrique à la peroxydase et test UV ;
• d'appliquer la méthode à différents substrats dans des milieux biologiques divers (sérum, aliments...) en utilisant des coffrets de réactifs du commerce ;
• d'adapter une méthode manuelle à un appareillage automatisé.

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **choix des conditions expérimentales ;**
- **affinité de l'enzyme pour le substrat ;**
- **réaction totale ;**
- **déplacement d'équilibre ;**
- **réactions couplées ;**
- **monoréactif ;**
- **témoin réactif ;**
- **automatisation ;**
- **contrôle de l'exactitude.**

1. PRINCIPE

1.1. Réaction enzymatique

Une réaction enzymatique peut être utilisée pour doser un des substrats qui y participe à condition que la réaction soit pratiquement *complète*.

Les principales conditions expérimentales à respecter sont les suivantes :
– choix d'une enzyme spécifique du substrat à doser ;
– choix d'une enzyme à affinité élevée pour le substrat (K_M faible) ;
– quantité relativement faible de substrat ($(S) << K_M$) et activité enzymatique importante de façon à rendre la réaction complète dans un temps acceptable (généralement 5 à 15 minutes) ;
– substrats secondaires en large excès ;

1.2.1. *Méthode colorimétrique à la peroxydase*

(voir la première manipulation proposée)

- *1er temps : réaction principale*

Le substrat à doser subit l'action d'une oxydase spécifique :

$$SH_2 + O_2 \xrightarrow{\text{oxydase}} S + H_2O_2$$

substrat réduit (SH_2) — substrat oxydé (S)

- *2e temps : réaction indicatrice*

Le peroxyde d'hydrogène formé est révélé colorimétriquement par une peroxydase :

$$H_2O_2 + A\,H_2 \xrightarrow{\text{peroxydase}} 2H_2O + A$$

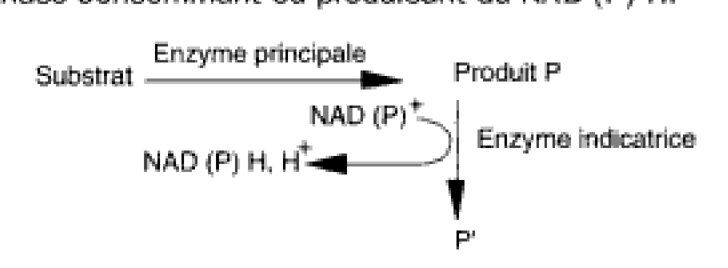
chomogène incolore à l'état réduit ($A\,H_2$) — coloré (A)

- *Exemples de SH_2 et d'oxydase spécifique* :
- glucose et glucose oxydase ;
- cholestérol et cholestérol oxydase ;
- glycérol phosphate et glycérol phosphate oxydase ;
- acide urique et uricase.

1.2.2. *Méthode en UV à 340 nm*

(voir la deuxième manipulation proposée)

Après transformation spécifique du substrat par une enzyme, le produit formé est révélé par une déshydrogénase consommant ou produisant du NAD (P) H.



La concentration en coenzymes pyrimidiques ne devra jamais être limitante.

- *Exemples de substrats et de couples d'enzymes* :
- glucose par l'hexokinase et la glucose-6 phosphate déshydrogénase ;
- urée par l'uréase et la glutamate déshydrogénase.

REMARQUES :

• Si le substrat peut être transformé directement par une désydrogénase, il est souvent indispensable de déplacer l'équilibre de la réaction soit en utilisant une substance-piège, soit en utilisant une réaction couplée.

Exemples :
– acide lactique par la lacticodéshydrogénase, puis déplacement d'équilibre avec l'alanine aminotransférase ;
– éthanol par l'alcool déshydrogénase et déplacement d'équilibre avec l'aldéhyde déshydrogénase.

• Plusieurs réactions auxiliaires peuvent se dérouler successivement avant la réaction indicatrice.

Exemples :
– pour le dosage des triacylglycérols, action préalable d'une lipase avant l'utilisation des glycérokinase puis de glycérol–1 phosphatase déshydrogénase ;
– pour le dosage du lactose, action prélable de la galactosidase avant l'utilisation de l'hexokinase et de la glucose-6 phosphatase déshydrogénase.

2. RÉACTIFS ET MATÉRIEL

- Spectrophotomètre si possible enregistreur ou informatisé.
- Cuves plastiques à usage unique.
- Pipettes automatiques.
- Chaînes d'analyse automatisée en flux continu ou automate à transfert.

Pour la première manipulation

- Coffret pour dosage enzymatique du glucose à la peroxydase, par exemple coffret Biomérieux, réf. : 6127-1.
- Solutions étalons de glucose à 1, 2, 3 et 4 g.dm^{-3}.
- Sérum de contrôle pathologique ou non.
- Milieux biologiques divers : sérum, jus d'orange, vin...

Pour la deuxième manipulation

- Coffret : dosage du glucose + saccharose. Référence Bœhringer Mamheim 139041.
- Solution de contrôle de glucose à 0,6 g.dm^{-3}.
- Milieux biologiques divers : milieu sucré en cours de fermentation, jus de fruits, vins...

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Première manipulation : dosage du glucose par la méthode à la glucose oxydase (GOD) couplée à la peroxydase (POD)

3.1.1. Expériences illustrant l'influence de quelques facteurs expérimentaux

Utiliser de préférence un spectrophotomètre enregistreur ou informatisé.

Expérience préalable de référence

• Travailler à température ambiante.

• Dans un cuve pipeter :
– 2,5 cm^3 du monoréactif (renfermant GOD à 10 000 $U.dm^{-3}$, POD à 300 $U.dm^{-3}$, chromogène réduit incolore, tampon phosphate pH 7,5) préalablement reconstitué ;
– 50 µl d'une solution étalon de glucose à 1 $g.dm^{-3}$.

• Mélanger rapidement et suivre la réaction en enregistrant l'absorbance à 505 nm contre un tube témoin (voir la fiche technique).

• Noter le temps minimum pour que l'absorbance soit stabilisée dans les conditions expérimentales choisies.

Modification de la température

Recommencer cette expérience en travaillant en cuve thermostatée à 25 °C, 30 °C, 37 °C.

Modification du rapport $\frac{\text{Réactif}}{\text{Echantillon}}$

• Influence de la concentration en enzyme. Remplacer les 2,5 cm^3 du monoréactif successivement par :
– 1,5 cm^3 de réactif + 1 cm^3 d'eau distillée ;
– 1,0 cm^3 de réactif + 1,5 cm^3 d'eau distillée ;
– 0,5 cm^3 de réactif + 2,0 cm^3 d'eau distillée ;

• Influence de la concentration en substrat. Remplacer la prise de 50 µl de solution étalon par :
– 30 µl de solution étalon + 20 µl d'eau distillée ;
– 20 µl de solution étalon + 30 µl d'eau distillée.

Pour toutes ces expériences, noter le temps nécessaire pour atteindre la fin de la réaction.

3.1.2. Dosage du glucose sérique

La fiche technique correspondant au réactif utilisé préconise :
– une incubation de 10 min à 37 °C ou de 20 min à 20 °C ;
– un rapport en volume $\frac{\text{Réactif}}{\text{Echantillon}} = 100$
– l'utilisation d'une solution étalon à 2 $g.dm^{-3}$;
– le réglage du zéro de l'appareil sur le blanc réactif.

• Réaliser les pipetages indiqués dans le *tableau 29.I.*

Tableau 29.I.

	Blanc réactif	Etalon	Dosage
Solution étalon à 2 $g.dm^{-3}$	–	20 µl	–
Sérum	–	–	20 µl
Monoréactif	2 cm^3	2 cm^3	2cm^3

• Mélanger puis lire l'absorbance après incubation.

3.1.3. Extensions possibles de la manipulation

Vérification de l'exactitude du résultat en utilisant un sérum de contrôle.

Recherche de la limite de linéarité de la méthode en remplaçant les 20 µl d'étalon à 2 $g.dm^{-3}$ successivement par 20 µl d'étalons à 3 $g.dm^{-3}$ et 4 $g.dm^{-3}$.

Dosage du glucose dans des boissons

• Dosage du glucose dans un jus d'orange :
– filtrer le jus d'orange ;
– le diluer 20 fois ;
– faire une prise de 20 µl ;

• Dosage du glucose dans le vin :
– le diluer 10 fois ;
– faire une prise de 20 µl.

Adaptation de la méthode à un appareil automatique à flux continu

La *figure 29.3.* propose un diagramme du flux (ou manifold).

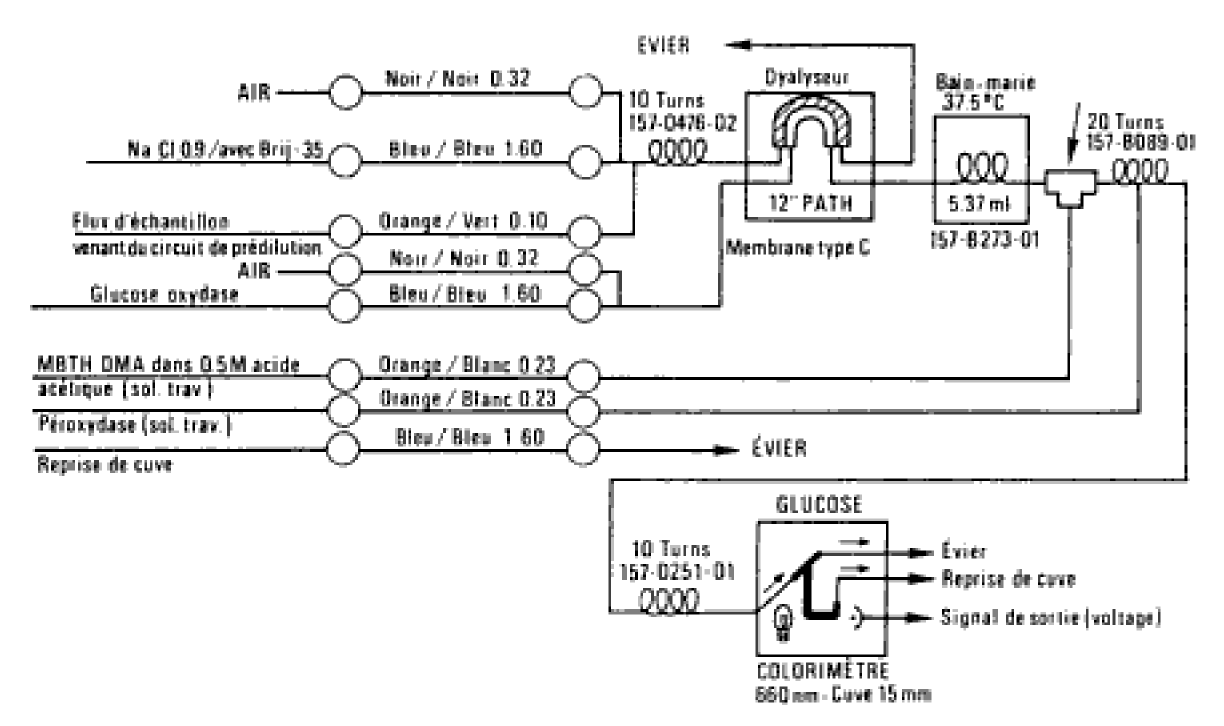


Fig. 29.4. Dosage du glucose par la glucose oxydase, en flux continu

3.2. Deuxième manipulation : dosage d'un mélange saccharose + glucose par méthode en UV

Le principe de la détermination des deux constituants du mélange repose sur le dosage du glucose avant et après l'hydrolyse enzymatique du saccharose.

3.2.1. Préparation des réactifs à partir des flacons du coffret

Bien respecter les précautions indiquées sur la fiche technique.

Les trois réactifs renferment notamment :
- R_1 : NADP $^+$, ATP, tampon pH = 7,6 ;
- R_2 : hexokinase et glucophosphate déshydrogénase ;
- R_3 : tampon pH 4,6 + ß fructosidase.

3.2.2. Dosage du glucose et du saccharose d'un jus d'orange

• Filtrer le jus d'orange et le diluer 100 fois pour le dosage du glucose libre et 200 fois pour le dosage du glucose total.

• Introduire dans les cuves les réactifs indiqués dans le *tableau 29.II*.

4. ANALYSE DES RÉSULTATS

4.1. Expérience préalable

- Rappeler les équations des réactions utilisées dans le dosage du glucose.
- A partir des résultats obtenus en 3.1.1., conclure sur l'influence de la température, du rapport $\frac{\text{Réactif}}{\text{Echantillon}}$ dans le dosage enzymatique d'un substrat en temps final.
- Proposer un choix de conditions expérimentales en tenant compte des critères de faisablité et de prix de revient.
- Commenter le choix des conditions expérimentales proposée par le fabricant et appliqué en 3.1.2.

4.2. Détermination de la glycémie

Soient :
- Cet : la concentration de la solution étalon en $mmol.dm^{-3}$;
- C x : la concentration sérique en $mmol.dm^{-3}$;
- $C\,x = Cet \times \frac{A\ dosage}{A\ étalon}$;

Commenter la valeur trouvée de la glycémie.

4.3. Dosage du glucose et du saccharose d'une boisson

- Schématiser l'enchaînement des réactions.
- Pour calculer les concentrations en glucides, on applique la loi de Beer-Lambert aux ΔA corrigées exprimées en 3.2.2. et on utilise le volume réactionnel V_R.

Soient :
- V_R : volume du test en cm^3 ;
- p : volume de l'échantillon en cm^3 ;
- l : épaisseur de la cuve en cm ;
- ε : coefficient d'absorbance linéique molaire en $dm^3\ mmol^{-1}.cm^{-1}$ (6,3 à 340 nm) ;
- d : facteur de dilution de l'échantillon.

• La formule permettant le calcul des concentrations molaires est la suivante :

$$C = \frac{V_R \cdot 10^{-3} \Delta A_{corrigée}}{\varepsilon \; l \; p \; d} \quad mol.dm^{-3}$$

• Transformation du résultat en concentrations massiques :

– cas du saccharose : $$p = \frac{V_R \cdot 10^{-3} \, 342 \, \Delta A_{saccharose}}{\varepsilon \; l \; p \; d} \quad g.dm^{-3}$$

– cas du glucose = : $$p = \frac{V_R \cdot 10^{-3} \, 180 \, \Delta A_{glucose}}{\varepsilon \; l \; p \; d} \quad g.dm^{-3}$$

• Calculer à l'aide de cette expression la concentration de la solution contrôle. Conclure sur la validité du dosage. Discuter les sources possibles d'erreur (voir chapitre 9).

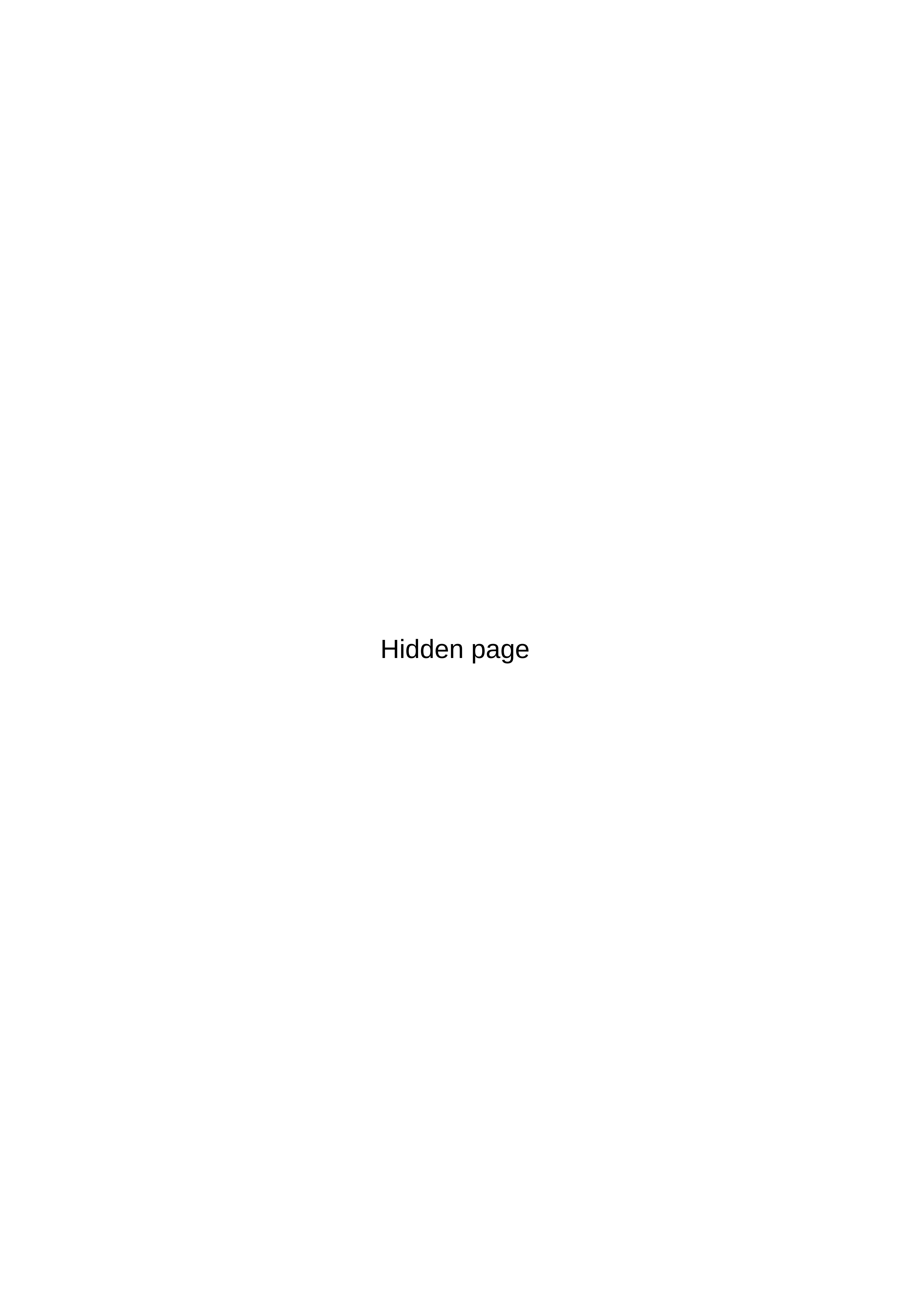
5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Comparer la spécificité des deux techniques vis-à-vis du glucose dans les milieux biologiques.

Exercice n° 2 :

On considère les systèmes de réactifs suivants : de quel glucide ou de quelle substance apparentée permettent-ils le dosage ?
– LDH, NAD $^+$, hydrazine, tampon pH 9.
– Glycérokinase, NAD $^+$, ATP, hydrazine, tampon pH 9, glycérol-1-phosphate déshydrogénase.
– Hexokinase, ATP, NADP $^+$, glucose-6-phosphate déshydrogénase, phosphoglucose isomérase.


Hidden page

En pratique, il existe trois possibilités pour réaliser cet objectif :
– dilution élevée de l'échantillon par rapport au réactif (mais perte de sensibilité) ;
– choix d'une enzyme peu affine à K_M élevé ;
– éventuellement, augmentation artificielle de K_M par addition d'un inhibiteur compétitif puisque :

$$KM_I = \left[1 + \frac{(I)}{K_I} \right]$$

avec :
– $KM_I = K_M$ apparente ;
– (I) la concentration en inhibiteur ;
– K_I la constante de dissociation de EI.

Sur un plan pratique, on retient $(S_0) \leq 0{,}2\ K_M$.

On compare alors la variation d'absorbance ΔAx obtenue avec l'échantillon pendant un temps bref en *début de la réaction* à la variation d'absorbance ΔA_{et} obtenue pendant le même temps pour une solution étalon *(fig. 30.1.)*. Comme dans toute mesure de vitesse, les conditions de chronométrage et de température doivent être scrupuleusement respectées.

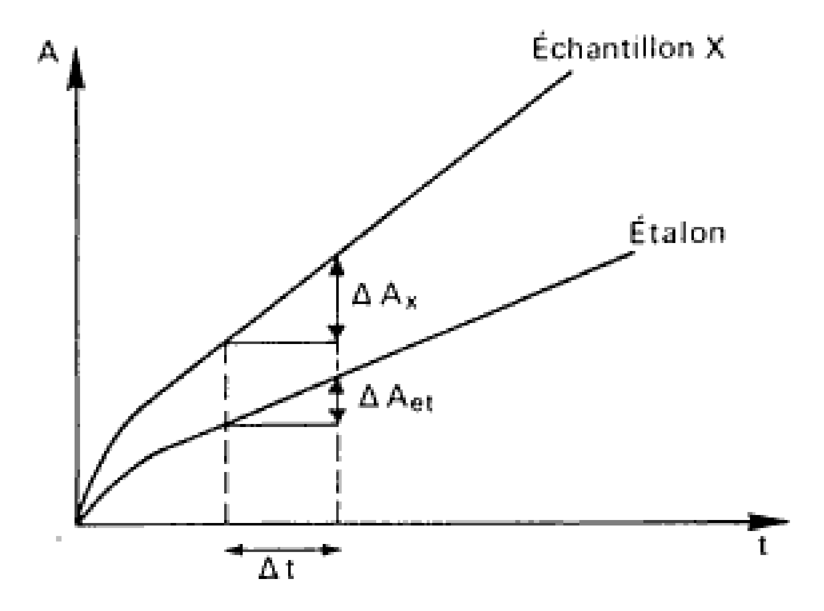


Fig. 30.1. Courbes A = f (t) pour l'échantillon et pour l'étalon

$$(S_0) = Cet \times \frac{\Delta Ax}{\Delta Aet}$$

(S_0) étant exprimé dans la même unité que Cet.

On peut donc dégager les différences entre les deux méthodes enzymatiques de dosage d'un substrat (voir chapitre 29) *(tabl. 30.I.)*.

2. MATÉRIEL ET RÉACTIFS NÉCESSAIRES

- Spectrophotomètre thermostaté, si possible enregistreur ou informatisé, sinon un chronomètre.
- Cuves en plastique à usage unique.
- Pipettes automatiques.
- Coffret pour dosage de l'acide urique en UV, par exemple Biotrol, référence AO2455.
- Sérum à analyser (précautions : voir chapitre 7).
- Sérum de contrôle étalonné.

3. MODE OPÉRATOIRE

Respecter les consignes du fabricant, variables suivant l'origine du coffret utilisé.

3.1. Premier temps : préparation

- Régénérer le réactif.
- Régler le spectrophotomètre à 340 nm, faire le zéro contre l'air et thermostater la cuve à 30 °C.

3.2. Deuxième temps : dosage

(Le mode opératoire proposé suppose l'utilisation d'un spectrophotomètre non enregistreur et non informatisé).

- Introduire dans la cuve 2 cm^3 de la solution de travail qui contient tous les réactifs sauf l'acide urique.
- Placer la cuve 5 minutes dans le système de thermostatisation.

• Ajouter *rapidement* 200 µl de sérum, mélanger par retournement et replacer la cuve dans le porte-cuve du spectrophotomètre.

• Déclencher le chronomètre et faire une lecture toutes les 15 secondes pendant 1 ou 2 minutes.

Si la concentration en acide urique de l'echantillon est trop élevée, recommencer l'expérience en diluant le sérum avec une solution de Nacl à 9 g dm^{-3}.

3.3. Troisième temps : étalonnage

Refaire une série de mesures en suivant le même mode opératoire avec un sérum étalonné de concentration connue en acide urique.

REMARQUE :
• Les volumes sont à adapter en fonction de la fiche technique du coffret utilisé.
• Le mode opératoire est à adapter si l'appareil est à vidange : on réalise l'équilibrage de la température dans un tube à hémolyse placé en bain-marie à 30 °C et on introduit le mélange réactif plus le sérum à doser au moment de la lecture.

3.4. Quatrième temps : expérience complémentaire

Recommencer un essai en attendant la stabilité de l'absorbance. Noter le temps nécessaire pour obtenir la fin de la réaction.

4. CALCULS ET ANALYSE DES RÉSULTATS

4.1. Analyse des courbes

• Tracer sur une même feuille les courbes traduisant les variations d'absorbance à 340 nm en fonction du temps pour l'échantillon et l'étalon.

• Discuter l'allure de ces courbes.

• Déterminer le coefficient directeur de chaque courbe $\Delta A\ min^{-1}$ *dans la partie linéaire.*

Exercice n° 3 :

Rechercher l'intérêt biologique de la détermination de l'uricémie.

Exercice n° 4 :

Lors d'un essai de mise au point d'une méthode de dosage en cinétique d'un substrat X, on a déterminé que le laps de temps après le déclenchement de la réaction pendant lequel la vitesse reste constante est de l'ordre de 7 secondes avec un $\Delta A \approx 8.10^{-3}$. Que conclure ? Quel(s) paramètre(s) peut-on modifier pour la mise au point des conditions pratiques de réalisation de cette méthode ?

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

Non.

H_2O_2 est classiquement dosé par l'intermédiaire d'une peroxydase qui transforme un chromogène, incolore à l'état réduit, en dérivé coloré.

Exercice n° 2 :

Voir 5.1.

$H_2O_2 + AH_2 \rightarrow A + 2H_2O$
coloré

Exercice n° 3 :

Augmentation en cas de goutte.

Exercice n° 4 :

Mesure trop imprécise et réalisation pratique délicate.

Nécessité de « ralentir » l'enzyme. Utilisation possible d'un inhibiteur qui augmente le K_M de l'enzyme.



EXTRACTION ET PURIFICATION D'UNE ENZYME : LE LYSOZYME

SOMMAIRE PAGE

Le but de cette manipulation est :

- **de dégager quelques règles générales à observer lors de l'extraction et de la purification d'une enzyme ;**
- **de les appliquer à un cas simple : le lysozyme du blanc d'œuf ;**
- **de suivre chaque étape de la purification par la détermination du rendement et du taux de purification ;**
- **de tester la pureté de la fraction obtenue par électrophorèse et CLHP.**

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **matière première : blanc d'œuf ;**
- **extrait brut ;**
- **enzyme purifiée ;**
- **concentration catalytique et activité catalytique spécifique ;**
- **unité enzymatique arbitraire ;**
- **rendement ;**
- **taux de purification ou enrichissement ;**
- **dosage par étalon externe en CLHP.**

1. PRINCIPE

On peut dégager des points communs dans la stratégie à élaborer pour extraire et purifier une enzyme (*tabl. 31.I*).

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Précautions à respecter

- Même si le lysozyme est une enzyme relativement robuste, il faudra toujours travailler :
– à basse température (centrifugeuse réfrigérée, bécher maintenu dans l'eau glacée pendant l'adsorption sur CM cellulose) ;
– le plus rapidement possible.
- Dès leur obtention, toutes les fractions seront conservées au réfrigérateur.
- Ne pas oublier de noter le volume des différentes fractions M, F, F_1, F_2, F_3 et E.
- Tenir rigoureusement un tableau de bord.
- Faire des essais avec des prises et des dilutions différentes.

3.2. Extraction du lysozyme

3.2.1. Première étape : fixation du lysozyme sur la CM cellulose

- Diluer un blanc d'œuf jusqu'à un volume de 200 cm^3 avec du tampon pH 10,0 en homogénéisant *doucement*.
- Filtrer sur gaze. Recueillir le filtrat M dans une éprouvette graduée. Noter le volume.
- Dans un bécher, ajouter à *20* cm^3 de M 2 grammes de CM cellulose en poudre. Agiter doucement puis laisser reposer 15 minutes.
- Centrifuger dans un tube conique, en centrifugeuse réfrigérée, 5 min à 1 500 g.
- Recueillir le surnageant F_1 (qui ne devrait pas renfermer de lysozyme).

3.2.2. Deuxième étape : rinçage

- Laver le culot avec 20 cm^3 de tampon pH 10,0 ; laisser reposer 5 min ; centrifuger et recueillir le surnageant F_2.
- Mettre en suspension le culot dans 10 cm^3 de tampon et transvaser dans une colonne à chromatographie. Rincer à nouveau avec un certain volume de tampon jusqu'à ce que le filtrat ne renferme plus de protéines. Soit F_3 la fraction recueillie.

3.2.3. Troisième étape : élution du lysozyme fixé par augmentation de la force ionique

• Faire passer sur la colonne 15 cm^3 de tampon glycocolle pH 10,0 renfermant 0,5 $mol.dm^{-3}$ de NaCl.

• Recueillir l'éluat E dans une éprouvette ; le conserver au froid.

REMARQUE : régénérer la CM cellulose utilisée en la lavant abondamment dans du tampon pH 10,0 sans NaCl. La conserver en présence d'azide à 0,2 % au réfrigérateur. Elle peut être alors réutilisée.

3.3. Mesure de l'activité enzymatique

• A 2,5 cm^3 de substrat (suspension de *Micrococcus lysodeikticus* à 0,4 $g.dm^{-3}$ en tampon pH 6,2) équilibré à 25 °C, ajouter au temps zéro 100 µl de la fraction à analyser : M ou F, ou F_2 ou F_3 ou E.

• Agiter et placer la cuve immédiatement dans le porte-cuve thermostaté à 25 °C.

• Suivre la variation d'« absorbance » à 450 nm pendant 2 à 3 min, soit par enregistrement, soit par lecture de l'absorbance toutes les 15 secondes.

Si on n'observe pas de partie linéaire, il faut recommencer l'expérience après dilution de l'échantillon étudié. A titre indicatif, on peut diluer M et E 10 fois.

3.4. Dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry

3.4.1. Etalonnage du spectrophotomètre

Préparer, à partir d'une solution étalon à 0,5 $g.dm^{-3}$ de sérum albumine, une série de tubes respectant les conditions suivantes :
- 0 à 100 microgrammes de sérum albumine par tube ;
- compléter tous les tubes à 1 cm^3 par une solution de NaCl à 9 $g.dm^{-3}$;
- ajouter 2 cm^3 d'une solution alcaline de sulfate de cuivre ;
- laisser reposer 20 minutes ;
- ajouter 0,2 cm^3 de réactif de Folin ;
- laisser les tubes 20 min à l'obscurité ;
- lire les absorbances à 690 nm.

3.4.2. Dosage

Doser les protéines des fractions M, F_1, F_2, F_3 et E. Il est conseillé de tester des dilutions différentes. A titre indicatif : prises de 0,5 et 1 cm^3 avec :

- des dilutions $\frac{1}{200}$ pour M et F ;

– des dilutions $\frac{1}{10}$ pour F_2 et F_3 ;

– des dilutions $\frac{1}{25}$ pour E ;

3.5. Contrôle de la pureté de l'extrait E

3.5.1. Par électrophorèse sur acétate de cellulose

• Comparer le comportement électrophorétique d'une solution de lysozyme pur à 2 $g.dm^{-3}$ à celui de M et de E. Il est conseillé de faire plusieurs dépôts superposés (voir chapitre 17).

• Après coloration et transparisation, faire un enregistrement densitométrique.

3.5.2. Par mesure d'absorbance à 280 nm

Faire une mesure sur E et sur une solution étalon de lysozyme à 0,2 $g.dm^{-3}$.

(Voir aussi chapitre 12.)

3.5.3. Par chromatographie liquide haute performance sur une colonne de gel

Pour le mode opératoire, se référer au chapitre 33.

• Choix des conditions expérimentales :
– colonne : Protein PACK 300 SW ;
– phase mobile : solution de NA_2HPO_4 et NaCl à pH 2,2 dégazée aux ultrasons et filtrée sur membrane 0,5 µm ;
– dépôt : boucle de 100 µl (éventuellement, 50 µl) ;
– débit : 1 $cm^3 min^{-1}$ (ne pas dépasser 70 bars) ;
– détecteur UV 280 nm ;
– enregistrement et intégration en pourcentages d'aire ou en étalonnage externe ;
– éventuellement dosage par étalonnage externe avec une solution de lysozyme dégazée, filtrée sur Millex, à 0,2 $g.dm^{-3}$.

• Laver la colonne avec de l'eau dégazée et filtrée très pure puis l'équilibrer avec la phase mobile.

• Injecter successivement :
– la solution de lysozyme étalon. Bien noter t_R ;
– puis une dilution 1/2 de M dégazée et filtrée. Observer le pic correspondant au lysozyme ;
– puis E pur dégazé et filtré. Repérer le pic du lysozyme (s'il y a plusieurs pics) et la concentration en $g.dm^{-3}$.

REMARQUE : attention à l'arrêt de l'appareil : laver la colonne avec de l'eau pure dégazée et filtrée pendant au moins 1 heure sous un débit de $1cm^3.min^{-1}$ pour éviter toute cristallisation des sels du tampon dans la pompe. Finir le lavage par un mélange filtré d'eau méthanol 90 V-10 V.

3.6. Extensions possibles de la manipulation

Etude de quelques propriétés du lysozyme sur l'extrait E, en particulier détermination des constantes cinétiques K_M et V_M.

- Préparer à partir de la solution-mère le substrat à 0,4 $g.dm^{-3}$ des solutions-filles en tampon pH 6,2 à 0,04, 0,08, 0,12, 0,20, 0,30 $g.dm^{-3}$.

- Pour chacune des six solutions de substrat, enregistrer l'« absorbance » à 450 nm en fonction du temps en suivant le protocole exposé en 3.3 et en utilisant 100 µl de E dilué 10 fois (à modifier éventuellement en fonction des résultats obtenus).

En déduire K_M et V_M exprimés en unités judicieusement choisies.

REMARQUE : toute cette manipulation peut être adaptée avec utilisation d'une mini-colonne, ce qui diminue la quantité de CM cellulose à utiliser, donc le prix de revient.

4. ANALYSE DES RÉSULTATS

4.1. Expression de la concentration en protéines des différentes fractions

- Tracer la courbe d'étalonnage ou calculer la droite de régression A = f (µg sérumalbumine dans la prise).

- Déduire la quantité x en µg de protéines dans la prise p diluée d fois.

Pour chaque fraction : $p = \frac{x.10^{-3}}{p\ d}\ g.dm^{-3}$ de protéines, exprimée en sérumalbumine bovine.

4.2. Expression de la concentration d'activité catalytique du lysozyme des différentes fractions

- Tracer sur un même graphe « A » $_{450\ nm}$ = f (temps) pour les M, F_1, F_2, F_3 et E.
- Commenter l'allure de ces courbes.
- Dans la partie linéaire, déterminer $\dfrac{\Delta A_{450\ nm}}{\Delta t \text{ en min}}$ pour p cm^3 de fraction diluée D fois.

Catc en unités arbitraires = $\dfrac{\Delta A/\text{min}}{10^{-3}\ p\ d}$ par cm^3 de fraction.

4.3. Compléter le tableau 31.III.

Tableau 31.III.

Fractions	Volume Vcm³	Protéines		% récupéré	Activité enzymatique			
		$mg.cm^{-3}$	Protéines totales en mg		$U.cm^{-3}$	U dans la fraction	% récupéré	AS $U.mg^{-1}$
M F_1 F_2 F_3 E								
Bilan			Protéines récupérées	% global		Activité récupérée	% global	

En déduire pour le passage de la fraction M à l'extrait E :

- le rendement = $\dfrac{\text{Activité totale de E}}{\text{Activité totale de M}} \times 100$
- l'enrichissement = $\dfrac{\text{Activité enzymatique spécifique de E}}{\text{Activité enzymatique spécifique de M}}$

Commenter les valeurs trouvées.

4.4. Pureté de l'extrait E

4.4.1. Observation et analyse de l'électrophorégramme

La fraction E peut-elle être considérée comme pure ?

4.4.2. Utilisation de l'absorbance à 280 nm

Calculer le coefficent d'extinction massique du lysozyme pur en $cm^{-1}.g^{-1}.dm^3$ ainsi que celui de l'extrait E. Conclure.

4.4.3. Analyse en CLHP

• D'après le profil d'élution de E, conclure sur la pureté de la fraction.

• Si un dosage par étalonnage externe a été réalisé, comparer le résultat obtenu avec celui fourni par le dosage colorimétrique. Le résultat peut être fourni diirectement par l'intégrateur, sinon on applique la formule :

$$\rho = \frac{\text{Surface pic du lysozyme de E}}{\text{Surface du pic du lyzozyme étalon}} \times \rho_{et} \times \frac{1}{d}$$

ρ en $g.dm^{-3}$

ρ_{et} étant exprimée en $g.dm^{-3}$.

Quelle masse de lysozyme a-t-on extrait à partir du blanc d'œuf ?

Faire une synthèse de l'ensemble des résultats. Conclure sur l'efficacité de la manipulation compte tenu qu'il y a une seule étape de purification en utilisant un échange d'ions. Comment pourrait-on optimiser la technique ?

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

Rappeler le mode d'action du lysozyme sur la paroi bactérienne. Justifier le numéro de code de cette enzyme E.C.3.2.1.14.

Exercice n° 2 :

Dans le protocole proposé, pourquoi a-t-on choisi d'utiliser une cellulose échangeuse de cations de préférence à une cellulose échangeuse d'anions ?

Exercice n° 3 :

Ecrire les équations des réactions correspondant à la fixation puis à l'élution du lysozyme sur la CM cellulose.

Exercice n° 4 :

Rechercher la documentation nécessaire et calculer le prix de revient de la manipulation.

Exercice n° 5 :

Dégager la différence de signification entre un dosage basé sur l'activité enzymatique et un dosage (comme la CLHP) basé sur le taux en protéine.

Exercice n° 6 :

Quelle méthode pourrait-on utiliser pour concentrer l'extrait E obtenu ? Proposer des moyens de conservation de l'enzyme concentrée.

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

Hydrolyse de la paroi bactérienne entre la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétyl-muramique. Le numéro de code commence par 3 (hydrolyse) puis 2 (liaison osidique).

Exercice n° 2 :

On choisit de fixer la protéine à isoler qui représente environ 10 % des protéines totales, ce qui nécessite moins de phase stationnaire.

Exercice n° 3 :

$$\sim COO^- \, Na^+_R + Lys^+_s \underset{(2)}{\overset{(1)}{\rightleftharpoons}} \sim COO^- \, Lys^+_s + Na^+_s$$

– fixation : sens (1)

– élution sens (2) par augmentation de la force ionique du tampon.

Exercice n° 5 :

La détermination d'une activité enzymatique est un dosage biologique spécifique applicable sur un mélange alors que le dosage par CLHP est un dosage non spécifique, basé uniquement sur la nature protéinique, qui suppose la séparation préalable de l'enzyme.

Exercice n° 6 :

– Concentration par ultrafiltration.
– Conservation sous forme lyophilisée ou en suspension dans une solution de $(NH_4)_2\,SO_4$.

Le but de cette manipulation est :

- **d'utiliser une technique chromatographique sur colonne de gel biospécifique pour isoler une protéine à partir d'un mélange complexe ;**
- **de tester la pureté de la fraction obtenue par électrophorèse ;**
- **de déterminer le rendement de récupération en protéines.**

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **gel d'affinité ;**
- **ligand-affinant ;**
- **interaction biospécifique ;**
- **capacité de fixation ;**
- **pureté d'une protéine.**

1. PRINCIPE

La chromatographie d'affinité utilise l'adsorption spécifique et réversible d'une molécule, l'affinant A sur un ligand L de structure complémentaire, immobilisé sur un support insoluble M :

$$M - L + A \rightarrow M - LA$$

Après avoir rincé la colonne pour éliminer les autres molécules non adsorbées du mélange on désorbe A :

$$M - LA \rightarrow M - L + A$$

Dans le cas particulier analysé ici :

- On choisit un ligand plurispécifique – le bleu de cibacron – qui montre une affinité pour certaines protéines : albumines, interféron, déshydrogénase, kinases. Dans le sérum, l'albumine étant à concentration très élevée on peut considérer ce gel comme spécifique de cette protéine. Les autres protéines sériques sont filtrées avec le premier tampon.

- L'albumine fixée est ensuite éluée par élution non spécifique en augmentant la force ionique du tampon.

- On mesure l'absorbance à 280 nm des fractions obtenues en sortie de colonne, ce qui permet de tracer le profil d'élution.

• On vérifie la pureté des deux « familles » de protéines obtenues par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou sur acétate de cellulose (on peut également vérifier la pureté de l'albumine par immunoélectrophorèse).

• On peut compléter la manipulation par une analyse quantitative des résultats.

2. RÉACTIFS ET MATÉRIEL

2.1. Pour la séparation

• Bleu de cibacron fixé sur agarose fourni hydraté par IBF.

• Colonne de chromatographie.

• Système d'injection.

• Collecteur de fractions ou tubes « jaugés » à 2 ml.

• Eventuellement pompe péristaltique à débit constant.

• Sérum humain décomplémenté. *Bien respecter les consignes de sécurité* pour l'utilisation de produits biologiques d'origne humaine (voir chapitre 7).

• Tampon I de lavage : tris-HCl 0,05 $mol.dm^{-3}$ + KCl 0,1 $mol.dm^{-3}$ à pH7.

• Tampon II d'élution : tris-HCl 0,05 $mol.dm^{-3}$ + KCl 1,5 $mol.dm^{-3}$ à pH7.

2.2. Pour le suivi de la séparation

Suivant le matériel dont on dispose :
– ou système de détection en continu réglé à 280 nm et relié à un enregistreur ;
– ou cuves plastiques pour lecture en lumière UV et spectrophotomètre réglable à 280 nm.

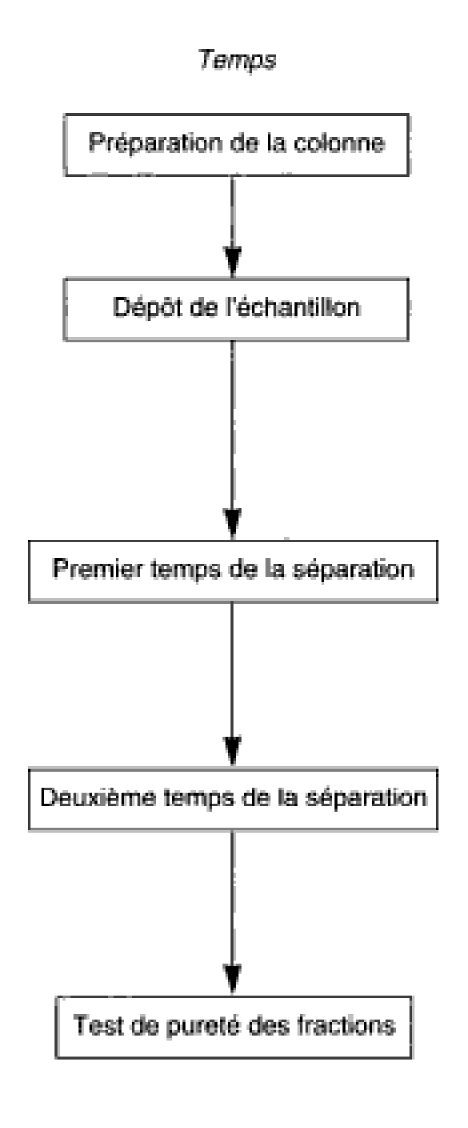
2.3. Pour la vérificatilon de la pureté des fractions protéiniques

Voir « réactifs et matériel » dans le chapitre 17.

3. MODE OPÉRATOIRE

Respecter toutes les précautions expérimentales indiquées dans le *tableau 32.I.* pour la chromatographie de gel-filtration.

Tableau 32.I.



Manipulation

- Utiliser 30 cm^3 de gel rincé dans le tampon I et dégazé.
- Equilibrer la colonne avec le tampon I.
- Régler le débit à 0,5 cm^3 min^{-1}.

- Déposer 0,5 cm^3 de sérum. Ouvrir la colonne. Commencer l'élution (éventuellement déclencher l'enregistreur).
- Faire une électrophorèse témoin du sérum déposé dilué deux fois.
- Mesurer l'absorbance à 280 nm d'une partie adéquate du sérum utilisé dilué 50 fois. Soit As.

- Recueillir les protéines non fixées par fractions de 2 cm^3.
- En mesurer l'absorbance à 280 nm en prenant comme référence le tampon I.
- Après la sortie des globulines (retour à une absorbance nulle), changer de tampon.

- Eluer l'albumine fixée avec le tampon II de force ionique élevée.
- Suivre l'élution comme précédemment en prenant comme référence le tampon II.
- Continuer l'élution jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm redevienne basse.

- Faire une électrophorèse des deux fractions correspondant aux deux pics d'élution principaux. A cause de la dilution chromatographique faire 4 dépôts superposés des fractions étudiées.

• Rééquilibrer la colonne avec le tampon I.

• Récupérer le gel après avoir noté la hauteur de gel dans la colonne.

• Le conserver au réfrigérateur en suivant les consignes du fabricant.

4. EXPLOITATION DES RÉSULTATS

4.1. Analyse qualitative

• A partir du profil d'élution enregistré ou de l'histogramme tracé en utilisant les mesures d'absorbance à 280 nm des différentes fractions :
– conclure sur l'allure des pics et la séparation chromatographique ;
– calculer le RS entre les deux fractions principales et discuter le résultat ;
– calculer le nombre de plateau théoriques N par mètre et le HEPT (voir chapitre 15) ;
– calculer le facteur de dilution pour l'albumine.

• Observer les électrophorégrammes des fractions étudiées

Conclure sur la pureté de l'albumine obtenue et la qualité de la séparation chromatographique.

4.2. Analyse quantitative

• Calculer le pourcentage de protéines totales récupérées.

$$\% = \frac{\Sigma A_{fraction}}{As \times 50} \times 100$$

• Les résultats expérimentaux permettent-ils d'évaluer le rapport $\frac{\text{Albumine}}{\text{Globulines}}$ du sérum utilisé ?

Conclure sur l'optimisation possible de la manipulation en prenant en compte les objectifs suivants : vitesse de séparation, charge de la colonne, pureté de l'albumine.

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

La capacité d'absorption de gel utilisé vis-à-vis de la sérumalbumine humaine et de 12 mg.cm $^{-3}$. Montrer que la quantité de gel utilisée est suffisante dans la manipulation effectuée (on admet que la quantité de support doit être au moins égale à cinq fois la valeur théorique).

Exercice n° 2 :

Quelle manipulation complémentaire serait indispensable pour calculer le pourcentage de récupération de la sérumalbumine ?

Exercice n° 3 :

Si on utilise le bleu de cibacron pour purifier une déshydrogénase à coenzyme pyridinique, quel mode d'élution choisira-t-on ?

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

0,5 cm^3 de sérum apporte environ 40 mg d'albumine. Nécessité d'une capacité d'absorption de 200 mg. Or 300 cm^3 de gel représente une capacité de 360 mg.

Exercice n° 2 :

Dosage spécifique de la sérumalbumine.

Exercice n° 3 :

Elution avec une phase mobile renfermant un coenzyme pyridinique.



INITIATION À LA TECHNIQUE DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE : APPLICATION AU DOSAGE DE LA CAFÉINE

SOMMAIRE

Le but de cette manipulation est :
- **de maîtriser l'utilisation du chromatographe et de ses annexes ;**
- **d'étudier quelques paramètres influençant la séparation (structure du soluté, pouvoir éluant de la phase mobile, débit) ;**
- **d'appliquer quantitativement la technique à un dosage de caféine dans différentes boissons par la méthode d'étalonnage externe.**

TERMES ET CONCEPTS IMPORTANTS :

- **fine granulométrie ;**
- **haute pression ;**
- **chromatographie en phase réverse ;**
- **force élutive ou pouvoir éluant ;**
- **élution isocratique ou en gradient ;**
- **traitement préalable de l'échantillon.**

1. PRINCIPE DE LA MANIPULATION

Toute chromatographie peut être transposée en chromatographie liquide haute performance ou CLHP à condition de disposer d'un matériau de garnissage de colonne qui supporte les hautes pressions.

Cette manipulation consiste à séparer et identifier des alcaloïdes dérivés de la purine (théobromine, théophylline et caféine) dans différentes boissons et à en doser la caféine.

La technique utilisée est le CLHP de partage, à polarité de phase inversée : la phase fixe, de fine granulométrie, est une silice greffée rendue apolaire et la phase mobile est un mélange polaire méthanol-eau utilisé dans des conditions isocratiques. L'élution est suivie par spectrophotométrie à 254 nm. La détermination quantitative de la caféine sera effectuée par la méthode de l'étalonnage externe.

2.2. Préparation des solutions

2.2.1. *Phase mobile*

Méthanol de qualité spéciale CLHP (servira également à réaliser toutes les solutions standards, inconnus et toutes les dilutions).

2.2.2. *Solutions standards*

- Caféine : solution-mère à 1 $g.dm^{-3}$ dans le méthanol.
- Théophilline : solution-mère à 0,5 $g.dm^{-3}$ dans le méthanol.
- Théobromine : solution-mère à 0,1 $g.dm^{-3}$ dans le méthanol.

(Difficulté de dissolution.)

2.2.3. *Echantillons à analyser*

- Mélange caféine + théophilline + théobromine respectivement à 0,5, 0,5 et 0,1 $g.dm^{-3}$ dans le méthanol.
- Thé léger filtré (l'eau chaude permet l'extraction de la caféine). Noter la masse pesée et le volume d'extraction.
- Coca-cola® dégazé par agitation énergique (Coca-cola® normal et Coca-cola® « light » sans caféine).

3. MANIPULATION

3.1. Conseils pratiques

- Des précautions s'imposent pour maintenir en bon état les têtes de pompe, la colonne etc. :

– filtrer au préalable phase mobile et solutions sur membrane pour éliminer toute particule ;
– éviter d'imposer de brusques variations de débit, donc de pression, à la colonne ;
– éviter de dépasser une certaine pression fixée par le constructeur ;
– dégazer les solutions injectées environ 20 min dans une cuve à ultrason ;

– protéger la colonne par une précolonne ;
– rincer en fin de manipulation la boucle et la colonne avec l'éluat (éventuellement avec du solvant pur) ;
– ne pas laisser la colonne se sécher.

• Précautions indispensables pour obtenir des résultats corrects :
– rincer l'ensemble seringue-injecteur avec la nouvelle solution avant toute injection ;
– tourner la poignée de la vanne d'injection le plus rapidement possible ;
– maintenir le réservoir de solvant pratiquement fermé pour éviter l'évaporation des solvants qui modifierait la composition de la phase mobile et la contamination par l'atmosphère ;
– démarrer l'enregistrement simultanément à l'injection.

3.2. Découverte de l'appareillage-montage et mise en route

Pour les détails opératoires, consulter la notice du constructeur.

• Reconnaître les différents modules.

• Réaliser le montage du chromatographe et de ses annexes et en faire un schéma fonctionnel.

• Amorcer la pompe.

• Equilibrer la colonne avec la phase mobile pendant 20 min et vérifier la stabilité de la ligne de base.

• Régler le zéro du détecteur.

• Régler l'enregistreur ou l'intégrateur en choisissant notamment la vitesse de défilement du papier et l'atténuation ; ces deux paramètres seront modifiés en fonction des résultats obtenus.

• Si on dispose d'un intégrateur, on s'initiera à l'utilisation de ses fonctions principales : identification des pics, programmation des différents types de méthode (pourcentage d'aires, standard externe).

3.3. Etude de quelques paramètres

3.3.1. Expérience préliminaire

• Conditions opératoires initiales :
– phase mobile méthanol-eau 40 v-60 v ;
– volume injecté 10 µl ;
– débit 0,8 $cm^3 min^{-1}$;
– détection à 254 nm.

• Injecter la solution-mère de caféine à 1 $g.dm^{-3}$.

• Faire une *analyse critique* du pic obtenu et modifier éventuellement la quantité injectée (dilution de la solution-mère) et les réglages de l'intégrateur.

• Recommencer l'expérience.

• Injecter du méthanol pur pour bien observer le temps mort t_M de la colonne.

3.3.2. Influence de la structure chimique dans une famille de dérivés puriques

• Injecter les solutions standards de théophilline et de théobromine.
• Noter les temps de rétention t_R.
• Faire un essai de répétabilité.

3.3.3. Analyse d'un mélange des trois dérivés puriques

Observer et critiquer la séparation des trois constituants.

3.3.4. Influence du débit

• Tester des débits de 0,6 $cm^3.min^{-1}$ et 1 $cm^3.min^{-1}$.
• Noter les temps de rétention et les pressions appliquées pour obtenir ces débits.

3.3.5. Influence de la phase mobile

• Tester les mélanges méthanol-eau 35 v-65 v ; 30 v-70 v ; 60 v-40 v ;
• Observer la séparation des pics.

3.3.6. En fonction du matériel disponible

Modifier :
– le volume de la boucle ;
– le volume mort ;
– la colonne (silice greffée en C_8 par exemple).

Pour la suite de la manipulation, tenir compte des résultats précédents pour fixer le débit et la composition de la phase mobile.

Si on dispose d'un appareillage permettant de travailler en gradient de polarité, utiliser les résultats précédents pour choisir le gradient.

3.4. Dosage de la caféine

• Choisir pour l'intégrateur le mode de calcul préprogrammé : « méthode avec étalon externe ». Cette méthode est utilisable puisque les injections sont rigoureusement identiques en volume.

• Injecter la solution standard de caféine à 0,25 $g.dm^{-3}$ (on pourra doubler cette injection).

– les pourcentages d'aires permettent-ils de conclure en pourcentages de composition massique ?

- Discuter l'influence du débit sur t_R et sur la HEPT.
- Le thé et le Coca cola contiennent-ils les trois dérivés puriques étudiés ?

Conclure sur :
– le choix d'un système chromatographique en fonction de la nature de l'échantillon ;
– l'optimisation d'une analyse en CLHP après avoir défini les objectifs à atteindre et les paramètres dont on dispose.

4.2. Analyse quantitative

Déterminer :
– la teneur en caféine exprimée en $g.dm^{-3}$ de Coca cola ;
– la teneur en caféine exprimée en $g.g^{-1}$ de thé.

En déduire la quantité approximative de caféine absorbée par verre de Coca-cola® et par tasse de thé.

Le Coca-cola® « light » est-il exempt de caféine ?

5. EXERCICES

Exercice n° 1 :

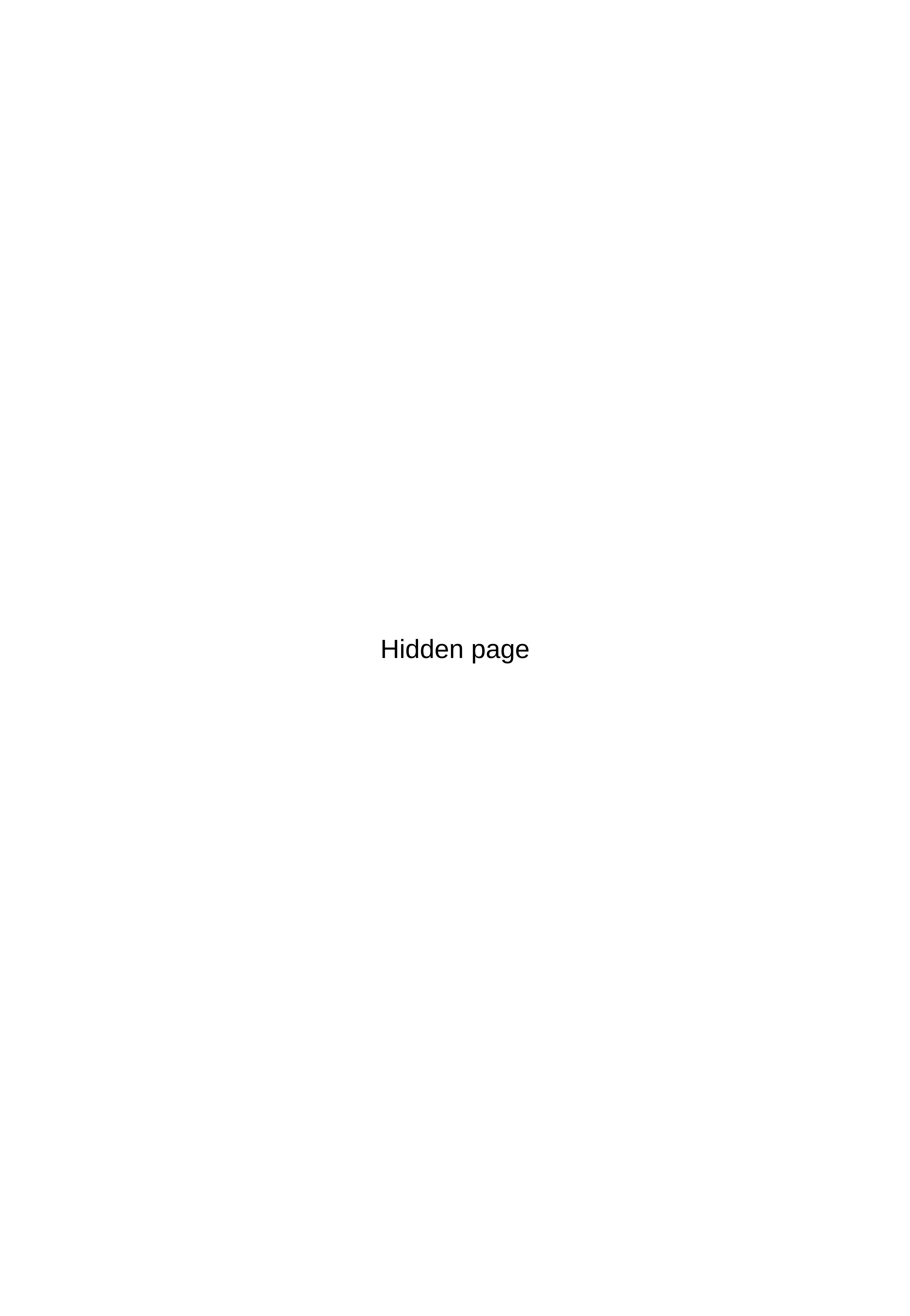
Pour les quatre exemples suivants importants en biochimie : glucides, acides aminés, acides nucléiques et protéines, proposer une méthode séparative par CLHP en précisant la phase fixe, la phase mobile, le détecteur.

Exercice n° 2 :

Pourquoi choisit-on souvent la longueur d'onde de 254 nm pour la détection des solutés dans l'effluent ?

Exercice n° 3 :

Des plaques par CCM en phase inversée sont commercialisées. Prévoir l'ordre de Rf si on sépare sur une telle plaque de silice greffée un mélange des trois dérivés puriques étudiés.


Hidden page

Hidden page

• *Manipulation* (2) :
– solutions étalons pour l'étalonnage interne : éthanol dans l'eau à 10 $g.dm^{-3}$; butanol dans l'eau à 10 $g.dm^{-3}$;
– produits à analyser : vins, liqueurs, prises d'échantillon au cours d'une fermentation préalablement traités.

3. MANIPULATION

3.1. Précautions expérimentales

– Tout échantillon doit subir un traitement préalable : filtration, séchage, dérivation.
– Vérifier les paramètres suivants dès le début de la manipulation : débit de la phase gazeuse, débit de l'hydrogène, débit de l'air, température du four en se plaçant dans des conditions isothermes pour une première analyse, températures de l'injecteur et du détecteur.
– Respecter les températures extrêmes d'utilisation de la colonne conseillées par le fabricant.
– Régler la température de l'injecteur environ 30 °C au-dessus de la température de la colonne.
– Ne pas courber l'aiguille au moment de son introduction dans le septum de l'injecteur.
– Rincer plusieurs fois la seringue avec l'échantillon avant l'injection.
– Toute injection devra être renouvelée une fois pour tester la variabilité du temps de rétention.
– Injecter toujours un volume faible, de l'ordre du microlite.
– Si la substance à analyser doit être dissoute, choisir un solvant qui n'a aucune affinité pour la phase stationnaire.
– Injecter l'échantillon dès que l'aiguille est enfoncée.
– Mettre en marche l'intégrateur simultanément à l'injection.
– Changer le septum toutes les cinquantes injections environ.
– Conserver les colonnes bouchées à chaque extrémité.

3.2. Découverte de l'appareillage et mise en route

– Bien respecter les règles de sécurité inhérentes à l'utilisation de bouteilles de gaz comprimés : elles doivent être attachées par une chaîne et éventuellement placées à l'extérieur (hydrogène).

– Faire un schéma fonctionnel du chromatographe.

– Observer la ou les colonnes.

– Se familiariser avec l'intégrateur.

– Suivre la notice d'emploi pour réaliser les différents allumages et réglages.

– Attendre la stabilisation en température du four, de l'injecteur et du détecteur.

– Attendre la stabilisation du débit de l'azote et de l'hydrogène.

3.3. Manipulation (1) : étude de quelques paramètres

– Rechercher au préalable les températures d'ébullition des alcools analysés.

– Utiliser l'intégrateur en méthode % d'aire après avoir réglé l'atténuation et la vitesse de déroulement du papier.

3.3.1. Essai préliminaire : injection d'éthanol pur

– Volume injecté : 1 µl.

– Température du four : 100 °C.

– Température de l'injecteur : 130 °C.

– Température du détecteur : 130 °C.

– Pression de l'azote en tête de colonne : 1,2 bars.

En fonction du pic obtenu, modifier l'atténuation de l'intégrateur et la sensibilité du chromatographe.

Recommencer l'expérience avec un volume d'injection de 2 µl, avec de l'éthanol ordinaire. On pourra également modifier la température du four.

3.3.2. Détermination du temps mort

Injecter 1 µl d'un hydrocarbure non retenu : heptane ou hexane.

3.3.3. Détermination des temps de rétention d'une série homologue

Injecter successivement du méthanol, du propan-1 ol, du butan-1 ol.

3.3.4. Comparaison des temps de rétention de deux isomères

Injecter du butan-2 ol, puis du butan-3 ol.

3.3.5. Résolution d'un mélange

• Injecter le mélange d'alcools à analyser. Observer la qualité de la séparation et les temps de rétention.

• Tester ensuite l'influence des facteurs expérimentaux suivants sur la séparation :
– température de la colonne (110 °C, 120 °C...) ;
– programmation de température de 70 °C à 120 °C avec un gradient de 10°/min ;
– débit du gaz vecteur.

En fin de manipulation, on pourra changer la colonne (longueur, phase stationnaire moins polaire).

3.4. Manipulation (2) : dosage de l'éthanol par la méthode de l'étalon interne

3.4.1. Préparation des solutions étalons

On dispose d'une solution-mère d'éthanol dans l'eau à 10 g.dm^{-3} et d'une solution-mère de butanol dans l'eau à 10 g.dm^{-3}.

– Préparer dans des fioles de 10 ml des solutions-filles d'éthanol à 1, 2, 5, 7 g.dm^{-3} d'éthanol.

– Mélanger dans des piluliers bouchant hermétiquement, volume à volume, les différentes solutions-filles d'éthanol et la solution-mère de butanol.

3.4.2. Préparation des échantillons à analyser

Le principe est de mélanger l'échantillon préalablement traité volume à volume avec la solution-mère de butanol à 10 g.dm^{-3}.

• Pour les boissons alcoolisées, distiller au préalable l'éthanol (voir chapitre 5) en réfléchissant au facteur de dilution.

• Pour un suivi de fermentation, centrifuger le prélèvement 20 min à 400 g puis filtrer le surnageant avec un filtre type Millipore (membrane de 0,5 µm). Diluer éventuellement le filtrat.

3.4.3. Dosage

• Choix des conditions opératoires :
– volume injecté : 2 µl ;
– température du four : 120 °C ;
– température de l'injecteur et du détecteur : 140 °C ;
– pression du gaz : 1,2 bars.

• Injecter successivement les cinq solutions étalons, puis les différents échantillons traités à analyser.

• Noter les aires indiquées par l'intégrateur.

Exercice n° 5 :

Une colonne capillaire a une longueur de 10 m, un diamètre interne de 0,25 mm, une épaisseur de film de 1 µm. Quel est son volume mort ?

Exercice n° 6 :

Soit l'aspect du pic de l'acétone sur carbowax 20 M (*fig. 34.2.*).

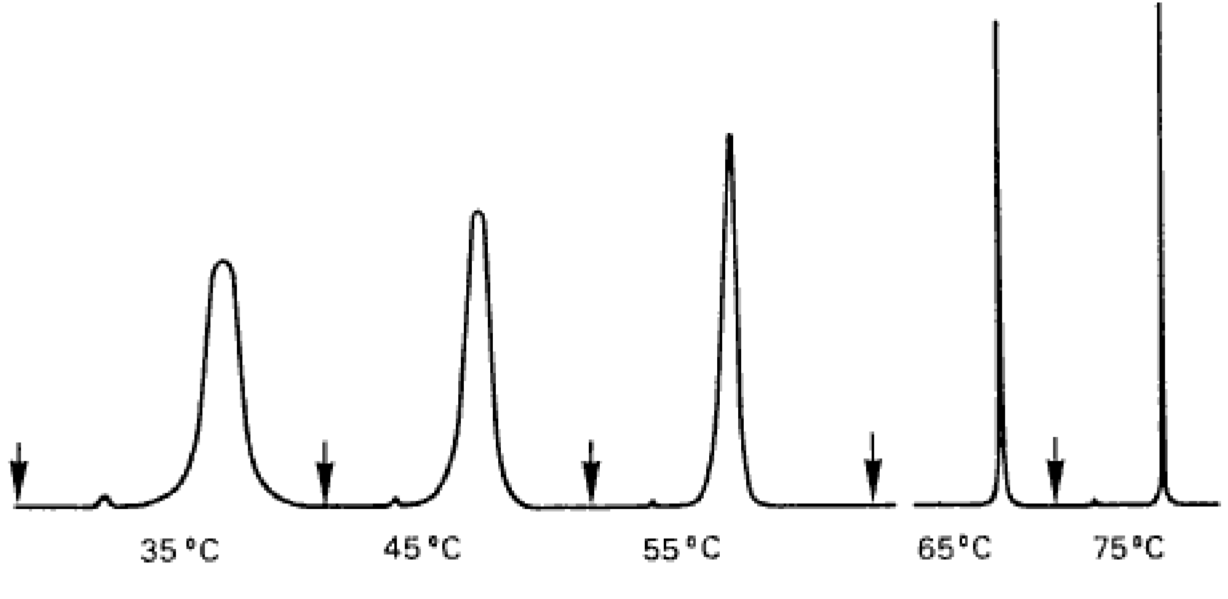


Fig. 34.2.

Que conclure sur la température d'utilisation de cette colonne ?

CORRECTION DES EXERCICES

Exercice n° 1 :

Phase stationnaire hydrophobe.

– Bien régler la température de la colonne ; bien régler le débit du gaz vecteur.

– Diminuer la température, augmenter la longueur de la colonne, diminuer le débit, augmenter le pourcentage d'imprégnation.

Exercice n° 2 :

Pour diminuer leur température d'ébullition (on empêche l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires).

Exercice n° 3 :

– Chromosorb : support plus ou moins poreux et naturel.

– Carbowax : phase stationnaire d'imprégnation (polymère hydrophile).

– 20 M : polymère de masse molaire 20 000.

– 2 % : taux d'imprégnation.

Exercice n° 4 :

(a) – monter la température de la colonne ;
– raccourcir la colonne ;
– revoir le choix de la colonne.

(b) – diminuer la quantité injectée ;
– augmenter le taux d'imprégnation ;
– augmenter la température de l'injecteur.

Exercice n° 5 :
0,50 cm^3.

Exercice n° 6 :

Utiliser la colonne à température supérieure à 60 °C (supérieure à la température d'ébullition de l'acétone) car la phase stationnaire et visqueuse à température plus faible.

La synthèse peptidique a permis l'approche et la résolution de nombreux problèmes biochimiques. Par exemple, citons la conception et l'évaluation d'analogues d'hormones et de neuromédiateurs peptidiques, la synthèse de substrats d'enzymes et de leurs inhibiteurs et la synthèse de séquences protéiques correspondant à des épitopes, ce qui a permis ainsi la production d'anticorps.

Les méthodes les plus utilisées sont des méthodes chimiques, nécessitant de nombreuses étapes, notamment la protection sélective des chaînes latérales, l'activation du groupement carboxylique et la déprotection, totale ou partielle. Cette série de réactions, délicate à réaliser en solution, a été simplifiée par l'introduction de méthodes en phase solide, notamment grâce à Merrifield en 1963. Le principe en est l'extension de la chaîne par son extrémité C-terminale, après fixation covalente du premier amino-acide sur une résine. Il est donc relativement facile de séparer le peptide des différents réactifs au fur et à mesure de la synthèse. Les appareillages automatiques utilisent ce procédé en continu, les différents réactifs, introduits par des pompes, circulant alternativement sur la colonne.

Deux stratégies principales s'appliquent à cette synthèse :

– La synthèse utilisant les BOC-aminoacides, dans laquelle les amino-acides sont bloqués à leur extrémité N-terminale par un groupement tertiobutyloxycarbonyle.

– La synthèse utilisant les FMOC-aminoacides, dans laquelle les amino-acides sont bloqués à leur extrémité N-terminale par un groupement fluorénylméthoxycarbonyle.

Dans le premier cas, la déprotection en cours de synthèse s'effectue avec de l'acide trifluoroacétique, mais pour séparer le peptide synthétisé de la résine, il faut utiliser de l'acide trifluorométhanesulfonique. Dans le cas de l'emploi des dérivés FMOC, d'utilisation plus récente, le déblocage en cours de synthèse se fait par une base, généralement la pipéridine diluée (20 %) et l'acide trifluoroacétique permet, en fin de synthèse, l'hydrolyse de la liaison peptide-résine. L'utilisation d'acide trifluoroacétique dilué (1 %) permet de conserver la protection des chaînes latérales, ce qui est un avantage lorsque l'on veut ultérieurement condenser plusieurs fragments peptidiques entre eux.

A côté de ces deux principales méthodes de synthèse, de nombreux travaux ont montré qu'il est également possible d'utiliser des protéases pour synthétiser des liaisons peptidiques. Pour résumer l'ensemble des méthodes décrites à ce jour, nous les classerons en deux groupes :

1. Celles par inversion de la réaction d'hydrolyse

Dans ce cas, l'enzyme est utilisée pour atteindre l'état d'équilibre (généralement peu favorable à la synthèse). Des rendements significatifs peuvent être obtenus :
– en présence de fortes concentrations de solvants organiques ;
– en déplaçant l'équilibre par consommation d'un des produits (par précipitation par exemple) ;
– dans un système biphasique où le produit, plus soluble dans le solvant organique, est soustrait du milieu aqueux au fur et à mesure de sa formation.

2. Celles par aminolyse d'un ester de l'acide carboxylique

Dans ce cas, l'enzyme réagit rapidement pour former un intermédiaire acyl-enzyme qui réagit avec un nucléophile pour former la liaison peptidique. Ce schéma peut s'appliquer aux protéases à sérine ou à cystéine.

Des synthèses variées ont été réalisées à ce jour en utilisant l'un ou l'autre de ces deux types de méthodes. De nombreuses mises au point ont été consacrées à ces applications [1-4].

Les avantages de l'emploi de protéases sont essentiellement la stéréospécificité (pas de risque de racémisation) et la non-nécessité de bloquer les chaînes latérales des acides aminés, du fait de la spécificité des enzymes.

Nous illustrons ce nouveau type d'utilisation des enzymes par la synthèse de l'aspartam, en présence de thermolysine. Cet édulcorant de synthèse est un dérivé dipeptidique, de structure :

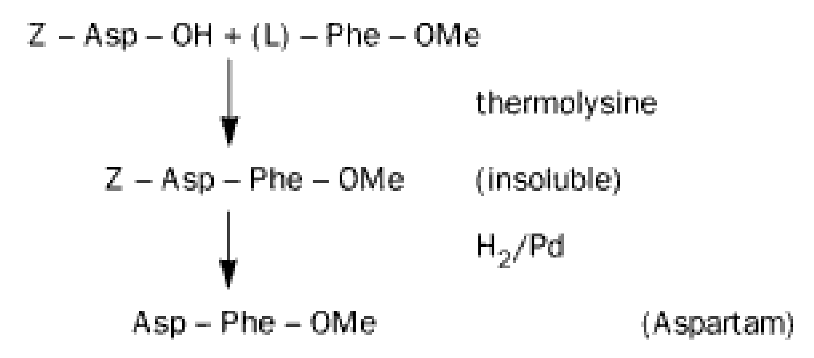
Asp–Phe–OMe

Sa synthèse par voie enzymatique a fait l'objet d'un nombre relativement important de publications qui ont notamment servi aux développements théoriques des principes de ce mode de synthèse peptidique [5-7].

Pour compléter cette suggestion d'expérience, nous proposons le dosage spectrophotométrique de l'activité enzymatique de la thermolysine, en utilisant un substrat synthétique. L'expérience peut être développée, complétée et utilisée d'un point de vue pédagogique.

1. SYNTHÈSE DE L'ASPARTAM

L'aspartam est un édulcorant très utilisé. C'est l'ester méthylique du dipeptide aspartyl-phénylalanine (Asp-Phe). Il peut être synthétisé par voie enzymatique,en présence de thermolysine, à pH 7. La thermolysine est une métalloprotéase à zinc extraite de *Bacillus thermoprotéolyticus*. Elle est relativement stable à température ambiante et son activité est optimale au voisinage de la neutralité. La synthèse de l'aspartam peut être réalisée comme suit [5] :



Il faut noter que, compte-tenu de la stéréospécificité de l'enzyme, on peut utiliser le mélange racémique : (D,L) Phe-OMe, moins coûteux. De plus, dans ce cas, on obtient un complexe insoluble Z-Asp-Phe-OMe, (D)-PheOMe, à partir duquel le Z-Asp-Phe-OMe est récupérée par lavage du précipité avec HCl.

1.1. Produits

– Thermolysine (extraite de *B.thermoproteolyticus*) (E.C. 3.4.24.4.) Boehringer Mannheim (Réf. 161586).

– Z-L-Asp (Bachem).

– L-Phe-OMe (Bachem).

– Formiate d'ammonium.

– Palladium/carbonate de calcium (5 % Pd) : catalyseur de Lindlar (Merck).

– Solvants chromatographiques :

A : Butanol : 50 ml ;
NH_3, H_2O à 3 % : 22 ml.
B : Butanol : 50 ml ;
CH_3COOH : 5 ml
H_2O : 15 ml.

– Plaques chromatographiques de silice : Merck-DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 ; Art. 5554.

1.2. Protocole expérimental

1.2.1. *Contrôle de la pureté des produits*

Dans un premier temps, on contrôlera la pureté des produits par chromatographie sur couche mince.

Préparer 5 ml des deux solutions suivantes : Z-(L)-Asp et L-Phe-OMe à 4 $mg.ml^{-1}$ dans C_2H_5OH.

Effectuer une chromatographie sur couche mince de silice. Laisser migrer environ 10 cm d'une part dans le solvant. A et d'autre part dans B. La visualisation peut se faire sous une lampe UV (à 254 nm).

Calculer les Rf des deux produits dans les deux solvants A et B.

1.2.2. *Synthèse du précurseur de l'aspartam*

Dissoudre dans 5 ml d'eau 267 mg (1 mmole) de Z-L-Asp et 215,5 mg (1 mmole) de L-PheOMe. Ajuster le pH à une valeur comprise entre 6,5 et 7,5. (Utiliser de préférence un système de thermostatisation maintenu à 30-40 °C).

Au temps t = 0, ajouter 500 µl d'une solution de thermolysine, préparée à 20 $mg.ml^{-1}$ dans H_2O. Prélever et déposer toutes les 30 minutes une goutte du milieu réactionnel sur une plaque de silice, sur laquelle on dépose également les deux molécules de départ (à partir de 30 minutes environ, on voit apparaître un trouble). La réaction est généralement terminée au bout de 5-6 heures environ.

1.2.3. *Synthèse de l'aspartam*

La déprotection du groupement benzyloxycarbonyle peut être faite de deux manières :

a. Hydrogénation catalytique par H_2
Ce procédé nécessite un appareillage d'hydrogénation et de l'hydrogène gazeux.

b. En présence de formiate d'ammonium et de palladium activé
Pour cela on dissout le précipité obtenu précédemment dans 2 ml de méthanol. Ajouter 126 mg (2 mmoles) de formiate d'ammonium. Ajouter 50 mg de palladium (5 % Pd). On laisse évoluer la réaction à température ambiante pendant environ 30 minutes. On centrifuge pour éliminer le catalyseur et on filtre le surnageant (utiliser une pipette Pasteur remplie de coton). On lave la pipette Pasteur avec 1 ml de méthanol. Récupérer le filtrat dans un petit bécher ou un ballon rodé. Evaporer soit au rotavapeur soit avec un sèche-cheveux. Redissoudre le résidu dans H_2O (5 ml) et lyophiliser de préférence.

1.2.4. *Caractérisation de l'aspartam*

• *Chromatographie sur couche mince*
On peut utiliser le solvant B vu précédemment et révéler soit sous UV à 254 nm, soit avec de la ninhydrine.

• *HPLC en phase réverse*

On peut utiliser une colonne de type ODS-2 (Pharmacia-LKB) ou LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) (Merck) de 25 cm. De nombreux éluants peuvent être utilisés. Pour une élution isocratique, utiliser par exemple un mélange KH_2PO_4 0,05 M (pH 2,5) – acétonitrile (60-40). La détection se fait à 210 nm.

1.2.5. Questions complémentaires

1. Pourquoi la synthèse du précurseur de l'aspartam est-elle possible en phase aqueuse ?
2. Qu'est-ce qui conditionne le choix d'une enzyme pour la synthèse peptidique ?
3. Comment envisageriez-vous la synthèse du peptide suivant : BOC-Ala-Phe-Leu-NH_2 ?

2. MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA THERMOLYSINE

La thermolysine, utilisée dans l'expérience précédente, est une endopeptidase extraite à partir de la bactérie *Bacillus thermoproteolyticus* qui appartient à la classe des métallo-protéases. Sa spécificité est dirigée vers les liaisons peptidiques pour lesquelles l'acide aminé en position P'1 (selon la terminologie de Schechter et Berger) [8] est hydrophobe, de préférence un résidu de phénylalanine ou de leucine. Ce type de spécificité, gouverné par l'aminoacide en P'1 limite beaucoup les méthodes de mesure d'activités puisqu'il exclut l'utilisation de dérivés chromophores ou fluorescents, tels qu'on peut en utiliser pour les protéinases à sérine comme la trypsine, la chymotrypsine, etc., c'est-à-dire notamment des dérivés paranitroanilides d'oligopeptides. Les premières méthodes employées consistaient à doser l'apparition, par leur réaction à la ninhydrine, des groupements α-NH_2 libérés après hydrolyse. La méthode était longue et ne permettait qu'un dosage discontinu.

Actuellement, la méthode la plus employée est le dosage spectrophotométrique de la diminution d'absorbance qui se produit lors de l'hydrolyse de furylacryloyl-di- ou tri-peptides, en particulier du (furyl-2-acryloyl)-3 glycyl-leucinamide (FAGLA).

hydrolyse ↓ (liaison C(=O)–NH de la glycine)

$$\text{Furyl}-CH=CH-\underset{\|\atop O}{C}-NH-CH_2-\underset{\|\atop O}{C}\downarrow NH-\underset{CH_2-CH(CH_3)_2}{CH}-CONH_2$$

Nous nous proposons d'étudier la cinétique d'hydrolyse de ce produit par la thermolysine et d'en déterminer les paramètres cinétiques.

2.1. Produits

– Thermolysine (extraite de *B.thermoproteolyticus*) (E.C. 3-4-24-4) Boehringer Mannheim, Réf. 161586.

– Furylacryloyl-Gly-Leu-NH_2 (Sigma, Réf. H3375).

– HEPES (Sigma, H 3375) (un autre tampon qui tamponne vers 7, comme le tampon phosphate, peut aussi être employé).

– $CaCl_2$.

– Cuves de spectrophotomètre en quartz.

2.2. Protocole expérimental

2.2.1. *Etablissement du spectre de différence*

Pour choisir la longueur d'onde d'étude, il est nécessaire d'effectuer d'abord le spectre de différence entre le FAGLA et ses produits d'hydrolyse enzymatique. Pour cela, préparer une solution $2\ 10^{-4}$ mol dm^{-3} de FAGLA dans un tampon HEPES 10^{-2} mol dm^{-3} et $CaCl_2$ 10^{-2} mol dm^{-3} pH 7,2. Dans une cuve (référence) placer 3 ml de substrat (1 ml si vous disposez de semi-microcuves). Dans une autre (mesure), placer 3 ml de substrat et ajouter 100 µl d'une solution environ $5\ 10^{-5}$ mol dm^{-3} de thermolysine (dans le tampon HEPES 10^{-2} mol dm^{-3}, $CaCl_2$ 10^{-2} mol dm^{-3} pH 7,2). (Prendre une masse moléculaire de 34,4 kDa pour la thermolysine). Laisser 15-20 minutes jusqu'à ce que l'absorbance, à une longueur d'onde donnée, n'évolue plus. Prendre le spectre de différence. Que constatez-vous ? Quelle est la longueur d'onde pour laquelle la différence d'absorbance est maximale ? Calculer $\Delta\varepsilon$ à 322 nm et à 345 nm. Comparer avec les valeurs de la littérature ($\Delta\varepsilon$ = 2300 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ à 322 nm et 317 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ à 345 nm), obtenues par Khan et Darnall [9].

Comparer les avantages et les inconvénients à effectuer la mesure à 322 ou à 345 nm.

2.2.2. *Détermination des paramètres cinétiques de la thermolysine*

Pour cette étude, il est préférable de travailler à 345 nm. Préparer une solution-mère de FAGLA de concentration 2.10^{-3} mol dm^{-3} dans le tampon HEPES 10^{-2} mol dm^{-3}, $CaCl_2$ 10^{-2} mol dm^{-3}, pH 7,2. Préparer des dilutions allant de 2.10^{-5} mol dm^{-3} à 10^{-3} mol dm^{-3} dans le tampon de travail. Pour chaque concentration, placer 3 ml dans une cuve spectrophotométrique. Déclencher la réaction enzymatique par addition de 50 µl d'une solution de thermolysine environ $5\ 10^{-5}$ mol dm^{-3}. Déterminer la vitesse initiale de la réaction. Lorsqu'il est difficile de déterminer avec précision une portion linéaire, il est possible de déterminer la vitesse de la réaction de pseudo-ordre 1 (si

[S] << k_M) à partir de l'expression ln [S] = f (t). [S] est obtenu par l'expression (At-A∞) / Δε, ou A_t et A∞ sont les absorbances à l'instant t et en fin de réaction respectivement.

Déterminer, à l'aide des représentations classiques (Lineaweaver-Burk, par exemple), le K_M de la réaction d'hydrolyse. A titre de comparaison, les valeurs que l'on trouve dans les publications sont d'environ 2 mmol dm^{-3}.

2.2.3. Extensions

Cette étude peut être complétée par celle des effets du pH et de la température [10], voire même de celle de l'hydrolyse d'analogues de type FA–Gly–X–NH_2, où X est un aminoacide autre que Leu [11]. Les deux publications citées sont très utiles pour une bonne compréhension du mécanisme d'action de la thermolysine et peuvent être la base de nombreux exercices d'enzymologie, notamment pour des travaux dirigés.

RÉFÉRENCES

[1] Fruton JS., Adv Enzymol 1982 ; 53 : 239-306.

[2] Chaiken IM, Komoriya A, Ohno M, Widmar F. Appl. Biochem Biotechnol 1982 ; 7 : 385-399.

[3] Jakubke HD, Kuhl P, Könnecke A. Ang Chem 1985 ; 25 : 85-93.

[4] Kullmann W. Enzymatic Peptide Synthesis. Boca Raton, USA : CRC Press.

[5] Isowa Y, Ohmori M, Ichikawa T *et al.* Tetrahedron Letters 1979 ; 28 : 2611-2612.

[6] Oyama K, Kuhara T, Nonaka Y. J Chem Soc 1981 ; 356-360.

[7] Ooshima H, Mori H, Harano Y. Biotechnol Letters 1985 ; 7 : 789-792.

[8] Schechter J, Berger A. Biochem Biophys Res Commun 1967 ; 27 : 157-162.

[9] Khan SM, Darnall DW. Ann Biochem 1978 ; 86 : 332-336.

[10] Kunugi S, Hirohara H, Ise N. Eur J Biochem 1982 ; 124 : 157-163.

[11] Izquierdo M, Stein RL J Am Chem Soc 1990 ; 112 : 6054-6062.

REMARQUE : pour obtenir les tirés à part des articles cités, outre les bibliothèques universitaires, il y a la possibilité d'écrire au Centre de Documentation CNRS :

Institut d'Information Scientifique CNRS Fourniture de Documents Primaires
2 Allée du Parc de Brabois – 54514 Vandœuvre-les-Nancy cedex
Le règlement se fait par vignettes qu'il faut acheter à l'avance. Les conditions seront explicitées en écrivant à l'adresse ci-dessus.



MÉTHODES DE DOSAGE DE L'URÉE

SOMMAIRE

PAGE

L'urée est un produit terminal du métabolisme qui correspond à l'élimination de l'azote protéique après transamination ou désamination ; 95 % de l'uréogénèse est localisée dans le foie.

Les valeurs normales de l'urée sérique varient avec l'âge et vont de 0,15 $g.l^{-1}$ pour le nourrisson jusqu'à 0,30 $g.l^{-1}$ pour l'adulte. Certaines pathologies sont caractérisées par des variations significatives de la concentration d'urée. En phase terminale de l'hépatite aiguë, par exemple, la concentration d'urée diminue. A l'opposé, dans le cas de néphrite, l'urée sérique peut atteindre des valeurs de 2 $g.l^{-1}$.

De ces observations, on voit qu'il est intéressant de disposer d'une méthode de dosage simple, fiable et économique.

La plupart des méthodes actuellement employées pour ce dosage peuvent être regroupées en deux familles : les méthodes directes, c'est-à-dire sans réaction préalable de l'urée, et les méthodes indirectes, c'est-à-dire après hydrolyse enzymatique de l'urée par l'uréase.

Méthodes directes

Ces méthodes sont essentiellement colorimétriques. Le réactif le plus utilisé est le diacétylmonoxime :

λ = 525 nm

hydroxy-3 diméthyl 5,6 triazine-1, 2, 4

La stabilisation de la coloration est réalisée avec de la thiosemicarbazine. Après chauffage durant 10 min à 100 °C, on effectue un dosage à 520-540 nm. Une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration d'urée peut être démontrée dans la gamme 0-450 $mg.l^{-1}$. Quelques kits commerciaux utilisent cette réaction (Sigma, etc.).

Une autre réaction analogue peut être obtenue en présence de diméthylbenzaldéhyde (H_2SO_4/CH_3COOH). Malheureusement, des molécules telles que la bilirubine et/ou l'hémoglobine peuvent interférer sur le dosage.

Méthodes indirectes

La première étape de ces méthodes est l'hydrolyse, par l'uréase, de l'urée avec formation de l'ion ammonium, NH_4^+, et de l'ion hydrogénocarbonate, HCO_3^-. Les protocoles de dosage les plus fréquemment employés peuvent être regroupés en trois catégories de méthodes.

Méthodes colorimétriques

L'essentiel des méthodes décrites repose sur la réaction de Berthelot, c'est-à-dire la réaction de NH_4^+ avec l'ion hypochlorite, ClO^-, et l'indophénol, en présence de phénol. A pH alcalin, on obtient une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'ion NH_4^+.

On peut également avoir une réaction analogue avec le réactif de Nessler.

Méthodes spectrophotométriques

L'ion ammonium, NH_4^+, formé au cours de l'hydrolyse peut être couplé à la réaction enzymatique mettant en jeu la glutamate déshydrogénase (GDH) :

$$NH_4^+ + \alpha\text{-cétoglutarate} + \boxed{NADH} + H^+ \rightarrow \text{glutamate} + NAD^+ + H_2O$$

La formation d'NH_4^+ s'accompagne d'une diminution d'absorbance à 340 nm due à l'oxydation de NADH. Une relation linéaire peut être démontrée dans le domaine de concentrations d'urée allant de 0 à 2,5 $g.l^{-1}$ avec une bonne corrélation (r = 0,997) si l'on effectue la comparaison avec la méthode colorimétrique à la diacétylmonoxime. Cette méthode peut être utilisée aussi bien en point final qu'en mesure cinétique, car les concentrations sériques d'urée sont très inférieures à la valeur du K_M de la réaction urée-uréase.

Méthodes électriques

D'autres méthodes peuvent être employées : la pH-métrie mesure l'échange de protons qui a lieu lors de l'hydrolyse de l'urée et l'on peut relier linéairement ΔpH à la concentration d'urée. La méthode conductimétrique peut également être appliquée. L'apparition des ions ammonium et hydrogénocarbonate s'accompagne d'une augmentation importante de conductance. Cette méthode est très sensible, et quelques microlitres de sérum suffisent à la mesure. Elle souffre toutefois de l'absence d'appareillages commerciaux suffisamment automatisés pour permettre un dosage en routine.

1. MÉTHODE À LA DIACÉTYL MONOXIME

Cette méthode est rapide, assez sensible et ne demande que peu de matériel.

1.1. Produits

– Solution-étalon d'urée à 0,4 $g.l^{-1}$.

– Solution de diacétyle monoxime (Sigma-Ref B 0753) à 140 nM.

– Solution de catalyseurs ($FeCl_3$ 1,6 nM ; thiosemicarbazide 5 nM ; H_2SO_4 1,3 M ; H_3PO_4 4 M).

Ces solutions peuvent être préparées à l'avance et elles se conservent 6 mois au réfrigérateur.

1.2. Protocole expérimental

Diluer 20 fois la solution-mère d'urée. Préparer une gamme étalon comprenant de 0 à 100 µl de la solution diluée. Ajouter 1 ml de la solution de catalyseurs, puis 1 ml de la solution de diacétylmonoxime. Traiter de la même manière 50 µl de l'échantillon à doser, en ayant soin de prévoir plusieurs dilutions.

Porter l'ensemble au bain-maire bouillant 6 min. Laisser refroidir environ 10 min et lire l'absorbance à 525 nm.

2. MÉTHODE UTILISANT LA RÉACTION DE BERTHELOT

Par action de l'uréase, l'urée est hydrolysée avec formation d'ions NH_4^+. En sa présence, l'ion hypochlorite, ClO^-, peut oxyder le phénol pour former le dérivé indophénol qui absorbe au voisinage de 560 nm.

L'intensité de la coloration est fortement augmentée en présence de nitroprussiate de sodium.

Compte tenu des réactifs qui entrent en jeu dans ce dosage, il peut être intéressant d'utiliser un kit de dosage et d'analyser et de discuter le protocole proposé. De nombreux fabricants proposent un dosage d'urée selon ce principe. Citons, sans aucune exclusive :
- Diagnostica Merck ;
- Sigma ;
- Biomérieux, etc.

En plus de l'initiation à l'utilisation d'un kit de dosage, il est possible de sensibiliser l'élève ou l'étudiant à des facteurs souvent peu développés en travaux pratiques, tels que :
- recherche de la longueur d'onde optimale d'un dosage ;
- stabilité dans le temps de la coloration obtenue ;
- test de reproductibilité ;
- comparaison entre des kits d'origine différente, etc.

Ce dosage, d'un prix de revient modeste, peut parfaitement servir de base à de telles illustrations.

3. MÉTHODES ENZYMATIQUES

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, ces méthodes sont basées sur le couplage de l'hydrolyse de l'urée, en présence d'uréase, avec la réaction à la glutamate déshydrogénase. Un tel dosage peut servir d'illustration aux notions de :
- réactions couplées ;
- dosage en point final ;
- dosage cinétique.

3.1. Dosage en point final

Dans ce cas, il est nécessaire d'avoir à la fois un couplage efficace (la réaction indicatrice devant se faire à une vitesse supérieure à celle de la réaction auxiliaire) et un temps de réaction relativement court.

On peut, à partir de ce dosage, envisager différents développements :

– dosage dans le sérum (prendre une prise d'essai d'environ 5-10 µl, car les valeurs normales sont de l'ordre de 2,5 à 7,5 $mmol.l^{-1}$) ;
– dosage dans l'urine (diluer environ 100 fois) ;
– dosage dans le lait. Pour cela, précipiter préalablement les protéines en additionnant 4 ml d'acide trichloroacétique 0,3 $mol.dm^{-3}$ à 1 ml de lait. Après filtration, effectuer le dosage avec 50-100 µl de surnageant ;
– dosage de l'ion ammonium provenant de l'ammoniaque dans les aliments et l'eau : pour cela il faut préparer un mélange réactionnel enzymatique ne contenant pas d'uréase. La comparaison du dosage en présence ou en absence d'uréase conduit au dosage de l'urée et de l'ion NH_4^+ (un certain nombre d'applications de ce type sont contenues dans la brochure : Chimie alimentaire : méthodes enzymatiques pour l'analyse agro-alimentaire, diffusée par Boehringer Mannheim France, 2, avenue du Vercors BP 59, 38242 Meylan Cedex).

3.2. Dosage cinétique

Dans ce cas, on recherche la mesure de la variation (diminution) d'absorbance en fonction du temps. Pour que la mesure puisse se faire facilement, il faut :

– diminuer l'activité enzymatique de la réaction indicatrice (donc diminuer la quantité de glutamate déshydrogénase) ;
– maintenir les conditions de couplage, c'est-à-dire que l'on doit toujours avoir :

$$\frac{V_2}{K_2} >> \frac{V_1}{K_1}$$

V_2, K_2 étant les paramètres cinétiques de la réaction à la GLDH et V_1, K_1 ceux de l'hydrolyse de l'urée par l'uréase.

3.2.1. Produits

On peut préparer une solution enzymatique de travail ayant la composition suivante :

– NADH : 0,30 mM ;
– α-cétoglutarate : 4 mM ;
– uréase : 2 à 5 000 $U.l^{-1}$;
– GLDH : 1 à 2 000 $U.l^{-1}$ (dans du tampon Tris-HCl 20 mM pH 8,0).

Cette solution se conserve sans problème 15 jours au réfrigérateur.

3.2.2. Protocole expérimental

Dans une cuve de mesure de spectrophotomètre, de préférence thermostatée à 25 ou 30 °C, on introduit 2 ml du milieu réactionnel. Déclencher la réaction enzymatique par addition de quantités variables (de 0 à 20 µl par exemple) de la solution étalon d'urée. Mesurer à 340 nm la diminution d'absorbance soit avec un enregistreur, soit tracer la courbe en fonction du temps à partir des valeurs lues au spectrophotomètre. Calculer la pente de la courbe en vitesse initiale.

Tracer la courbe-étalon obtenue en portant la vitesse initiale en fonction de la concentration d'urée.

3.3. Extensions

L'utilisation des méthodes enzymatiques peut permettre une extension, notamment la démonstration de l'importance d'un couplage par la réaction indicatrice. Pour cela, on peut préparer une solution de travail comprenant NADH, α-cétoglutarate et uréase aux concentrations et activités vues dans le paragraphe 3.2. et y ajouter des quantités croissantes de GLDH allant de 100 à 2 000 $U.l^{-1}$. On constatera que la vitesse apparente de la réaction augmente jusqu'à un plateau qui correspond à la vitesse de la réaction d'hydrolyse de l'urée par l'uréase.

Des renseignements sur ces méthodes d'analyse figurent dans l'ouvrage : HU Bergmeyer, Principes de l'analyse enzymatique. Technique et Documentation, Ed, 1979.



DOSAGE DE LA VITAMINE C. COMPARAISON DE DIFFÉRENTES MÉTHODES

SOMMAIRE **PAGE**

L'acide ascorbique (ou vitamine C) est une molécule très répandue dans les aliments. De plus, sa production commerciale est importante et de faible coût. De très nombreuses études ont été faites, que ce soit sur son métabolisme ou sur ses influences multiples dans des domaines aussi variés que les réactions immunitaires, le système cytochrome P-450, la division cellulaire, l'hydroxylation du collagène et de l'élastine, etc. De nombreuses mises au point lui ont été consacrées [1–2].

Les méthodes de dosage de la vitamine C sont très variées et utilisent principalement ses propriétés réductrices. Le choix de la méthodologie dépend surtout de sa concentration et de la complexité du milieu dans lequel on la dose.

La réaction d'oxydation de la vitamine C s'écrit :

O=C, HO–C, HO–C, H–C, HO–C–H, CH2OH, O → O=C, O=C, O=C, H–C, H–C, HO–C–H, CH2OH, O $+ 2e^- + 2H^+$

acide-L-ascorbique → acide-L-déhydroascorbique

La méthode de dosage la plus utilisée est celle du titrage volumétrique de la forme réduite par le dichloro-2,6-phénolindophénol. Des variantes de ce dosage incluent un dosage potentiométrique ou une modification photométrique qui diminue la difficulté d'appréciation du virage du réactif, notamment si l'extrait brut est coloré. La critique majeure que l'on fait à ce dosage est de ne mesurer que la forme réduite et non la vitamine C totale [3].

De très nombreuses autres méthodes existent, notamment la méthode de Roe et Kuether [4]. Dans cette technique, l'acide ascorbique est oxydé et réagit avec la dinitro-2,4 phénylhydrazine. L'osazone formée est ensuite extraite en milieu sulfurique et donne une coloration rouge dosable au spectrophotomètre.

Une méthode plus récente utilise la réduction par l'acide ascorbique du sel de tétrazolium MTT (bromure de (diméthyl-4,5 thiazolyl-2)-3-diphényl-2,5 tétrazolium) en présence de PMS à 3,5. Le MTT-formosan ainsi formé peut être dosé à 578 nm. Ce dosage est actuellement disponible en kit (Bœhringer-Meylan).

1. MÉTHODE UTILISANT LE DICHLORO-2,6 PHÉNOL INDOPHÉNOL

Le dosage est effectué à l'aide d'une solution de dichloro-2,6 phénol indophénol, préalablement étalonnée à l'aide d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue.

Les solutions aqueuses n'étant pas stables (oxydation), on préparera les solutions dans de l'acide métaphosphorique (à environ 20 $g.l^{-1}$).

1.1. Produits

- Dichloro-2,6 phénol indophénol.
- Acide métaphosphorique.
- Acide ascorbique.

Solution-étalon : peser 0,25 g d'acide ascorbique et dissoudre dans une solution d'acide métaphosphorique à 20 $g.l^{-1}$. Compléter à 500 ml. Le titre sera vérifié par un dosage iodométrique : un prélèvement de 10 ml de la solution d'acide ascorbique sera dosé, en présence d'empois d'amidon par une solution d'iode 5 $mmol.dm^{-3}$.

1.2. Protocole expérimental

• *Etalonnage de la solution au dichlorophénol indophénol*

Dans un bécher, ajouter successivement :
- 5 ml de la solution étalon d'acide ascorbique ;
- 15 ml d'eau distillée.

Ajouter le dichlorophénol jusqu'à apparition d'une coloration rose pâle persistante pendant environ 30 secondes.

• *Dosage de la vitamine C d'un jus de citron*

Dans un bécher, ajouter successivement :
- 5 ml de jus de citron ;
- 5 ml de la solution d'acide métaphosphorique à 20 $g.l^{-1}$;
- 10 ml d'eau distillée.

Doser par la solution de dichlorophénolindophénol. En déduire le titre en vitamine C du jus de citron.

2. MÉTHODE UTILISANT LA DINITRO-2,4 PHÉNYL HYDRAZINE

L'acide ascorbique, oxydé par le dichloro-2,6 phénolindophénol en acide déhydroascorbique est ensuite transformé en osazone par la dinitro-2,4 phénylhydrazine. En milieu sulfurique concentré, ce composé a une coloration rouge qui peut être dosée par spectrophotométrie à 520 nm.

2.1. Produits

– Dichloro-2,6 phénol indophénol (solution précédente).

– Acétate d'isoamyle.

– Dinitro-2,4 phényl hydrazine.
Préparer 100 ml d'un mélange H_2O/H_2SO_4 conc (3:1 v/v). Lorsque le mélange est tiède, rajouter 2,0 g de dinitro-2,4 phénylhydrazine. Cette solution se conserve environ 1 mois.

– Thiourée.
Dissoudre 1,6 g de thiourée dans 10 ml d'un mélange éthanol/H_2O (1:1 v/v).

– H_2SO_4 85 %.
Ajouter *avec précautions* (en refroidissant au fur et à mesure) 85 g d'H_2SO_4 concentré, dans 15 ml d'eau distillée.

2.2. Protocole expérimental

• Préparation de l'échantillon à doser
A 1 ml de jus de citron, on ajoute 5 ml de solution de dichlorophénolindophénol. On ajoute ensuite, avec précautions, 5 ml d'acétate d'isoamyle. On laisse reposer 30 secondes et on sépare l'excès de colorant, par agitation et décantation dans une ampoule à décanter. Refaire plusieurs fois l'opération.

• Dosage
Dans un tube à essai, ajouter :
– 1 ml de la phase aqueuse précédente (prévoir plusieurs dilutions) ;
– 1 goutte de solution de thiourée ;
– 1 ml de la solution de dinitrophénylhydrazine.

Porter une heure à 50 °C, refroidir et conserver dans la glace. Ajouter goutte à goutte 5 ml d'H_2SO_4 à 85 % (Attention ! Utiliser une propipette). Laisser reposer 30 minutes.

Effectuer dans les mêmes conditions un blanc ne contenant pas de dinitrophénylhydrazine.

Réaliser dans les mêmes conditions, une gamme-étalon correspondant à des concentrations d'acide ascorbique allant de 0 à 50 mg/l (Attention ! Ne pas oublier d'oxyder préala-

blement la solution-mère d'acide ascorbique par le dichlorophénol indophénol). Effectuer le dosage à 520 nm.

3. AUTRES DÉVELOPPEMENTS POSSIBLES

D'autres méthodes peuvent être appliquées facilement au dosage de la vitamine C et faire l'objet de comparaisons avec les deux techniques précédemment décrites.

Ainsi, Baket et Lowe ont mis au point en 1985 un dosage sensible basé sur la réduction par l'acide ascorbique de l'ion cuivrique en ion cuivreux, ce dernier étant complexé par une solution de néocuproine (diméthyl-2,9 phénantholine-1,10). Le dosage s'effectue à 450 nm. Une relation linéaire peut être obtenue entre l'absorbance et la prise d'essai d'acide ascorbique (allant de 2 à 20 µg). La publication originale décrit très bien le dosage et propose une comparaison avec la méthode au dichlorophénolindophénol [6].

Enfin, une méthode cinétique a été très récemment introduite par Sultan et Bishop (1990). Elle est basée sur la mesure de la variation d'absorbance qui accompagne l'oxydation de l'acide ascorbique par les ions Ce (IV) en milieu acide sulfurique. Ils ont ainsi pu montrer :
– que l'oxydation suit une loi d'ordre 1 par rapport à l'acide ascorbique en présence d'un excès de Ce (IV) ;
– que, pour des temps de réaction donnés, l'absorbance est une fonction linéaire de la concentration d'acide ascorbique [7]. Les expériences présentées par les auteurs sont simples et ne nécessitent pas d'appareillage compliqué. Elles peuvent être très utiles pour des illustrations pédagogiques, notamment en cinétique de réaction chimique.

RÉFÉRENCES

[1] Seib PA, Tolberg BM. Ascorbic acid : chemistry, metabolism, and uses, Adv. in Chemistry, 1982 ; 9 vol. 200, Washington, D C (American Chemical Society).

[2] Englard S, Seifter S. Ann Rev Nutr, 1986 ; 6 : 365-406.

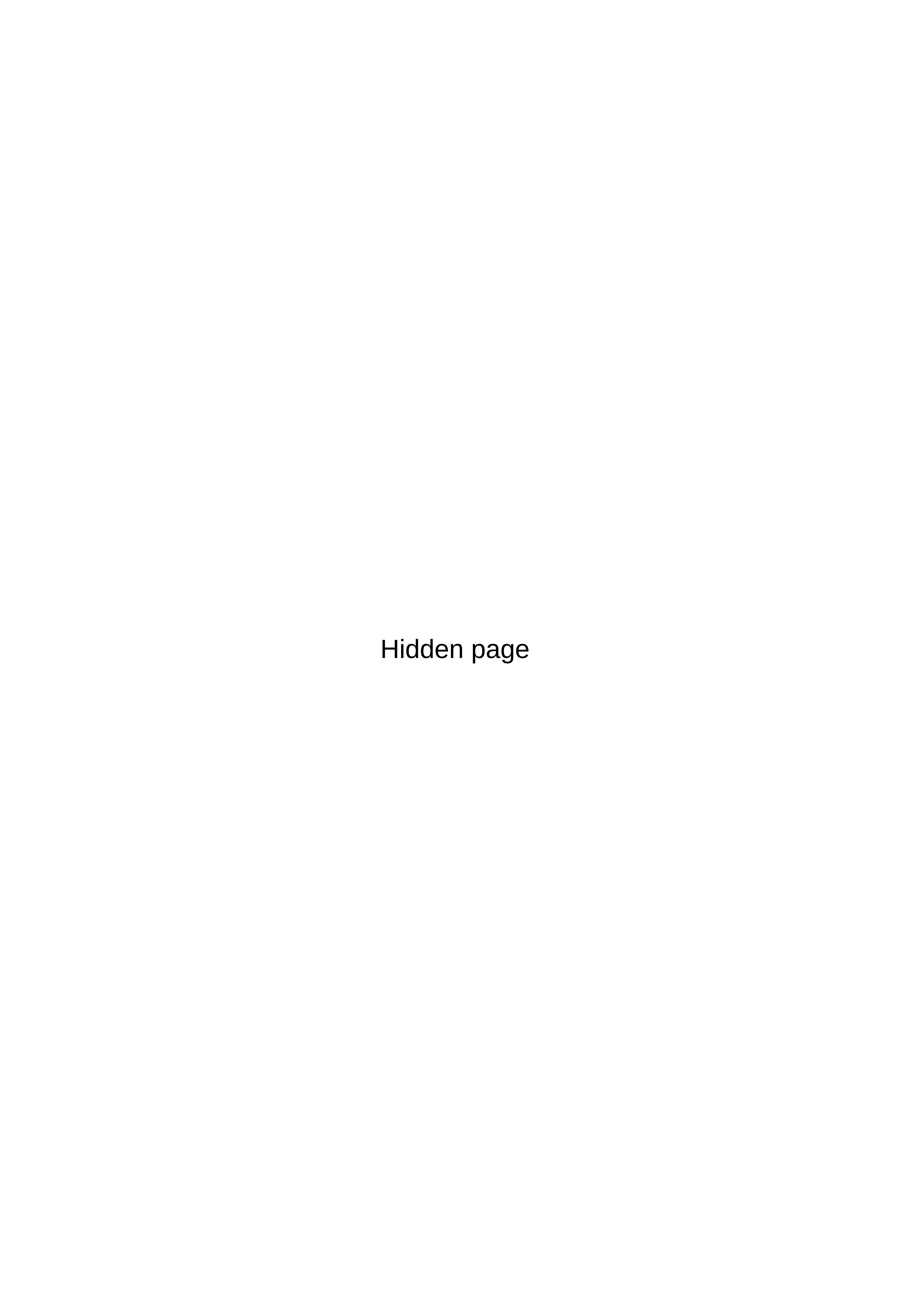
[3] Loeffler H J, Ponting J D. Ind Eng Chem, 1942 ; 14 : 846.

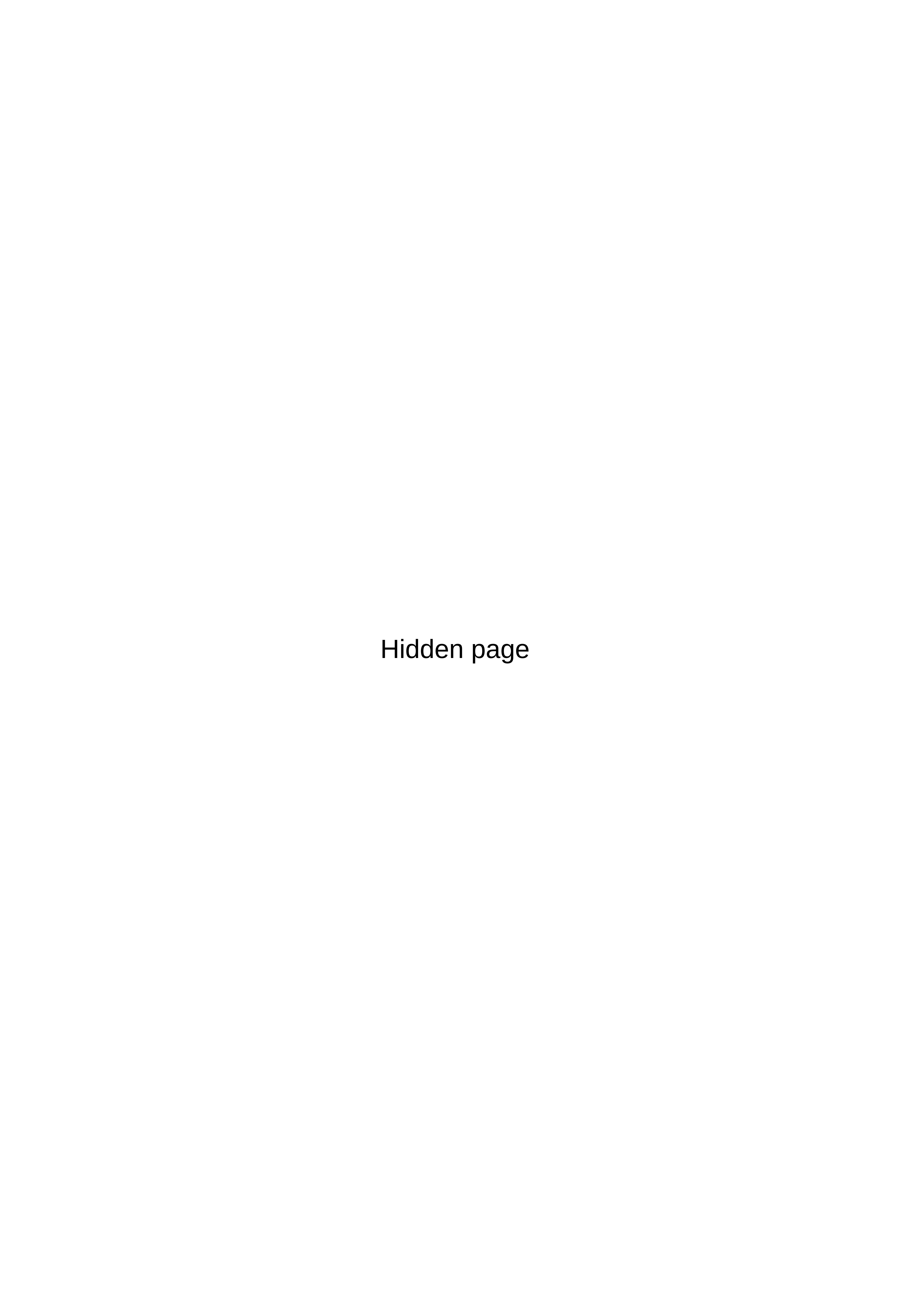
[4] Roe J H, Kuether C A. J Biol Chem 1943 ; 147 : 339.

[5] Deneke U, Michal G, Beutler H O. Deutscher Lebensmittel-Rundschan, 1978 ; 74 : 400–403.

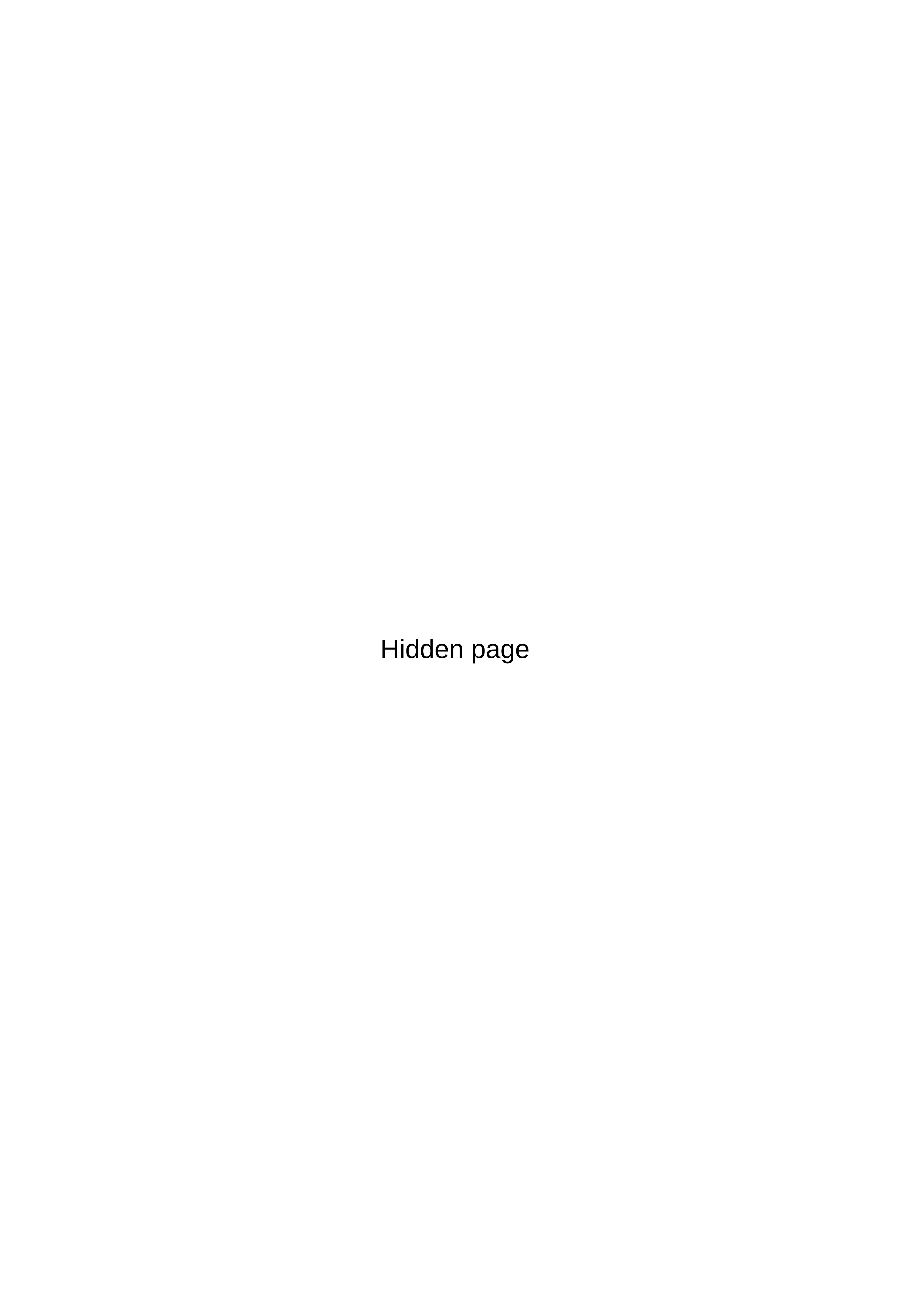
[6] Baker W L, Lowe R. Analyst, 1985 ; 110 : 1189-1191.

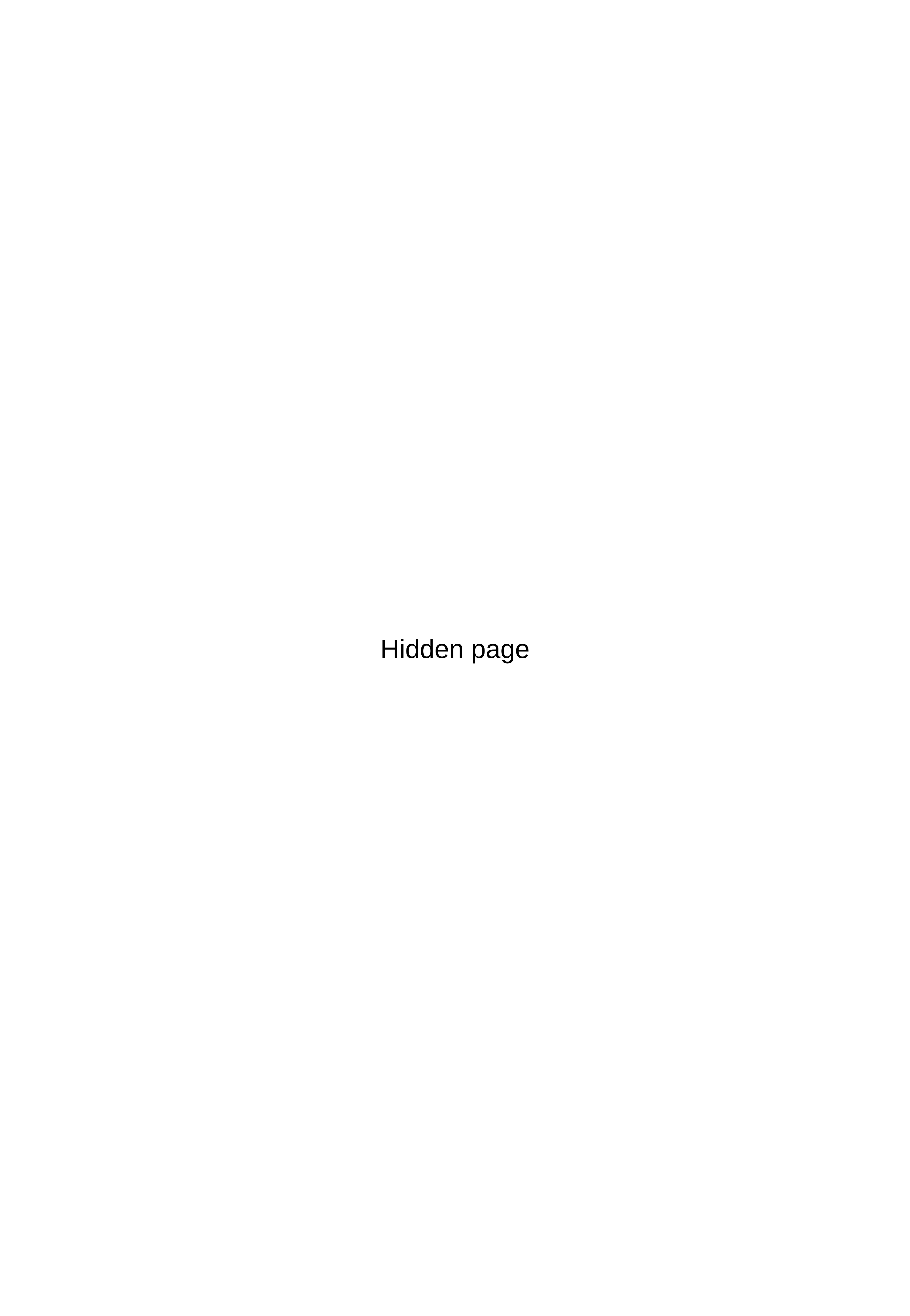
[7] Sultan S M, Bishop E J. Pharma Biomed Anal, 1990 ; 8 (4) : 345-351.

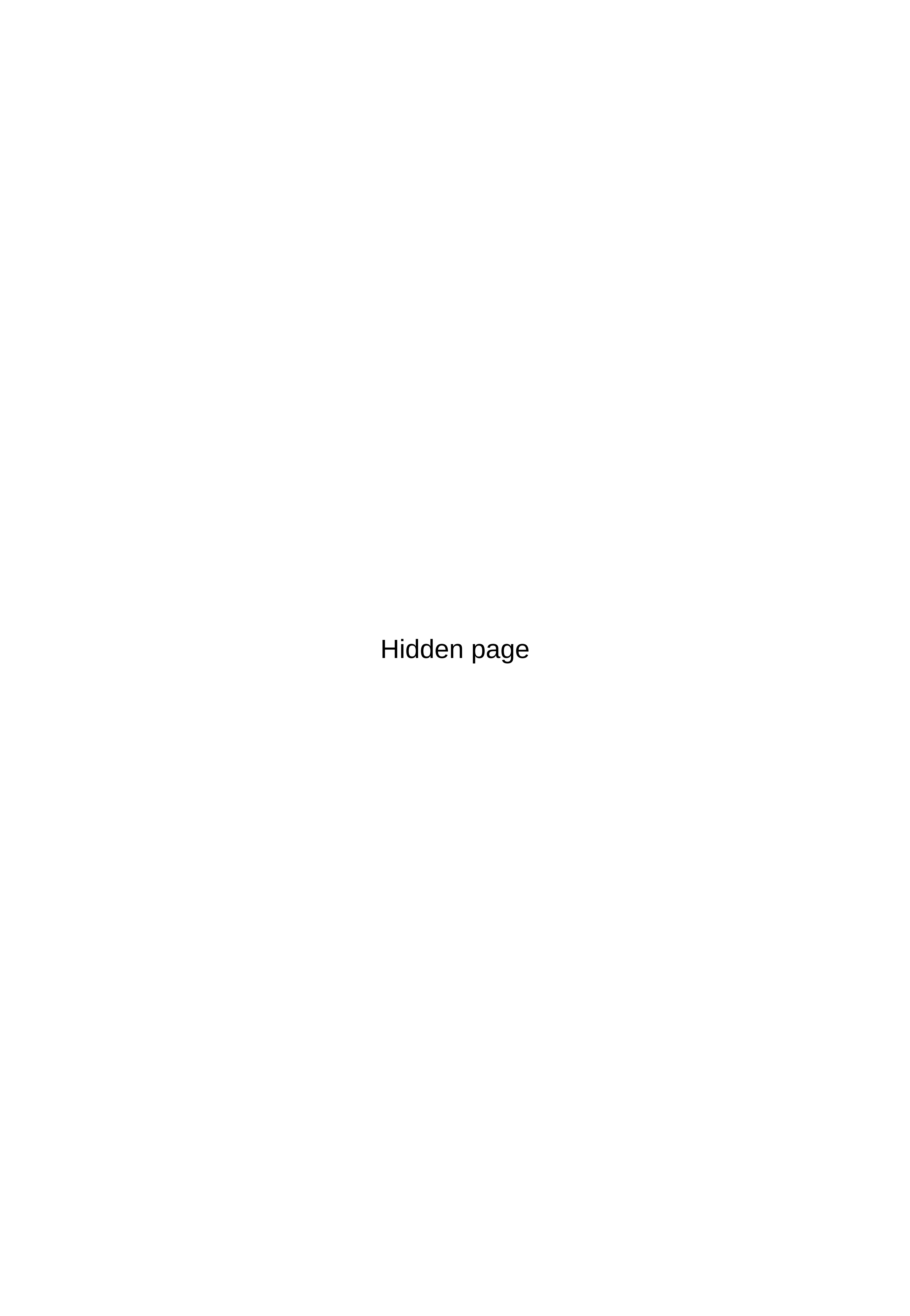



Hidden page

Hidden page


Hidden page


Hidden page


Hidden page

BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Manipulations d'analyse biochimique

M. Gavrilovic
M.-J. Maginot
C. Schwartz-Gavrilovic
J. Wallach

Cet ouvrage, accessible aux élèves préparant un baccalauréat technologique de Biochimie-Génie biologique, est destiné aux étudiants poursuivant des études technologiques dans les disciplines biologiques : BTS Analyses biologiques, Biochimie, Biotechnologies, DUT.

Cette nouvelle édition revue et corrigée présente l'ensemble des manipulations de base de l'analyse biochimique actualisées. Elle intègre des protocoles expérimentaux adaptés à l'apprentissage, l'utilisation et le contrôle des analyses en spectrophotométrie, électrophorèses, CLPH, CPG...

Par une démarche progressive intégrant un grand nombre d'exercices corrigés de manière détaillée, ce livre permet à l'étudiant de préparer ses séances de travaux pratiques pour en tirer le profit maximal.

Pour le professeur, il constitue, à la fois, un recueil de savoir-faire et un ensemble de protocoles expérimentaux concernant les domaines de l'analyse médicale, de l'agro-alimentaire, du contrôle des eaux, qui font de cet ouvrage un outil précieux.



ISBN : 2-7040-0836-1

D. line - paris